N° d'ordre : 254 / E

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS-SCIENCES

PAR

Jean RIESS
INGÉNIEUR E.N.S.C.S.
ASSISTANT A LA FACULTÉ DES SCIENCES

PREMIÈRE THÈSE

DERIVES PHOSPHORES D'HORMONES STEROIDES

DEUXIÈME THÈSE

PROPOSITIONS DONNEES PAR LA FACULTÉ

Soutenues le 25 Juin 1963 devant la
Commission d'Examen :

MM. J. VIVIEN.....Président
J. P. EBEL.....Examinateurs
G. OURISSON.....

N° d'ordre : 254 / E

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS-SCIENCES

PAR

Jean RIESS

INGÉNIEUR E.N.S.C.S.
ASSISTANT A LA FACULTÉ DES SCIENCES

PREMIÈRE THÈSE

DERIVES PHOSPHORES D'HORMONES STEROIDES

DEUXIÈME THÈSE

PROPOSITIONS DONNEES PAR LA FACULTÉ

Soutenues le 25 Juin 1963 devant la
Commission d'Examen :

MM. J. VIVIEN.....Président
J. P. EBEL.....Examinateurs
G. OURISSON.....

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

FACULTE DES SCIENCES
DE
L'UNIVERSITE DE STRASBOURG

Doyen : Professeur G.MILLOT

Doyens honoraires: A.DANJON, A.KIRRMANN, P.LACROUTE, H.J.MARESQUELLE.

Professeurs honoraires: Ed.BAUER, P.de BEAUCHAMP, R.BONNET
L. BOUNOURE, H.CARTAN, G.CERF, Cl.CHABAUTY, A.CHRETIEN,
A. DANJON, J.DENY, CH. EHRESMANN, M.FRECHET, H. GAULT,
L. HACKSPILL, A.HEE, R.ROCART, A.KIRRMANN, G.LEMEE,
P. L'HERITIER, A.LICHNEROWICZ, L. NEEL, H.OLLIVIER, G.RIBAUD
Ch.SADRON, E.TERROINE, R.THIRY, H.VILLAT, Et.WOLFF, J. Yvon.

Professeurs:

H.WEISS.....	T.	Physicochimie des Hydrocarbures
G.HUGEL.....	T.	Chimie du Pétrole
H.J. MARESQUELLE...	T.	Biologie végétale
A. ROUSSEL.....	T.	Calcul différentiel et intégral et théorie des fonctions
H. FORESTIER.....	T.	Chimie générale
J. ROTHE.....	T.	Physique du Globe
P. LACROUTE.....	T.	Astronomie
J.H.VIVIEN.....	T.	Zoologie et Embryologie expérimentale
L.BOISSELET.....	T.	Chimie analytique du Pétrole
A.MAILLARD.....	T.T.P.	Chimie
S.GORODETZKY.....	T.	Physique générale et Physique nucléaire
L.SACKMANN.....	T.T.P.	Mécanique des fluides
J.BYE.....	T.	Chimie minérale et Chimie physique
R.LOMBARD.....	T.	Chimie organique
Melle PEREY M.....	T.	Chimie nucléaire
Ph.PLUVINAGE.....	T.	Physique expérimentale
S. GOLDSZTAUB.....	T.	Minéralogie et Pétrographie
P. JOLY.....	T.	Biologie générale
H. BENOIT.....	T.	Physique générale
J.L.KOSZUL.....	T.	Topologie
P. CUER.....	T.	Physique générale et Physique corpusculaire
G.MILLOT.....	T.	Géologie et Paléontologie
R. LECOLAZET.....	T.T.P.	Physique du Globe
H. SAUCIER.....	T.T.P.	Minéralogie
R. ROHMER.....	T.	Chimie minérale
Melle GILLET S.....	T.T.P.	Paléontologie
Melle GAGNIEU A....	T.T.P.	Botanique
R. THOM.....	T.	Analyse supérieure
S. NIKITINE.....	T.	Physique générale
F. STUTINSKY.....	T.	Physiologie générale
B. WURTZ.....	P.s.C.	Chimie biologique
J. BRENET.....	T.T.P.	Chimie Physique

./.

G. OURISSON.....	T.T.P.	Chimie
Fr.STEPHAN.....	P.s.C.	Zoologie
Cl.LEVI.....	T.T.P.	Biologie générale
A. COCHE.....	T.T.P.	Physique nucléaire
R. CERF.....	T.T.P.	Physique
M. BERGER.....	T.T.P.	Mathématiques
J. FRENKEL.....	T.T.P.	Mathématiques
P. TAGLANG.....	T.	Physique
J.P. LONGCHAMP.....	P.s.C.	Physique
J. BOSCHER.....	P.s.C.	Mécanique des Fluides
A. DELUZARCHE.....	T.T.P.	Chimie
J.B.DONNET.....	T.T.P.	Chimie Physique
R. ARMBRUSTER.....	P.S.C.	Physique
A. ROCHE.....	P.s.C.	Physique du Globe
L. HIRTH.....	T.	Microbiologie
J. YOCOOZ.....	T.	Physique théorique
A. SIGOT.....	P.s.C.	Zoologie
J. COGNE.....	P.s.C.	Géologie
A. FUCHS.....	T.	Mécanique rationnelle
A. GALLMANN.....	P.s.C.	Physique
P. MIALHE.....	T.T.P.	Physiologie animale
J.P. EBEL.....	T.	Chimie biologique

Maîtres de Conférences :

J. PARROD	Chimie
R. WEY.....	Chimie
J. WUCHER.....	Physique
Mme D. MAGNAC.....	Physique
Mme M. BRINI.....	Chimie
M. DAUNE.....	Physique
J.P. ADLOFF.....	Chimie nucléaire
J. GREMILLARD.....	Mathématiques
G. PERNY.....	Physique
J. LEVISALLES.....	Chimie
D. BERNARD	Méthodes Mathématiques de la Physique
R. BARO.....	Physique
G. LAPRAZ	Botanique
H. DANAN	Physique
M. ZISMAN	Mathématiques
E. DANIEL	Physique
F. NORGUET	Mathématiques
P. CHEVALLIER.....	Physique
J. LERAY	Physique
H. DURANTON.....	Botanique
R. WEISS	Chimie
P. CARTIER	Mathématiques
J.P. SCHWING	Chimie
M. SIESKIND	Physique
G. MONSONEGO	Physique mathématique
P. GABRIEL	Mathématiques

Secrétaire : G. SAINT-PE

Aux miens

A mes amis

A Monsieur le Professeur OURISSON,

Je lui dois ma formation de chimiste Organicien et le sujet du travail exposé ici. Il m'a guidé par ses conseils et sans cesse encouragé de son soutien amical.

Qu'il trouve ici l'expression de ma profonde gratitude.

Je tiens à exprimer mes remerciements

à Messieurs les Professeurs J. VIVIEN et J.P. EBEL qui ont bien voulu juger cette thèse;

à Monsieur le Professeur P. MANDEL pour les fructueuses discussions que j'ai pu avoir avec lui, et pour avoir suggéré l'idée initiale qui a conduit aux développements décrits ici;

au Professeur F. CRAMER à Darmstadt et au Docteur A.M. MICHELSON à Dublin pour leurs conseils éclairés et la possibilité qu'ils m'ont donnée de venir me familiariser dans leurs laboratoires avec leurs méthodes de travail;

à la Direction de N.V. ORGANON et à Monsieur S.A. SZPILFOGEL pour la fourniture de produits de départ;

à Madame E. POUSSE, Mlle H. HERRMANN et Monsieur F. HEMMERT pour leur aide technique;

à tous mes camarades de laboratoire.

INTRODUCTION

Les esters et amides des acides phosphoriques et pyrophosphoriques jouent un rôle biochimique fondamental. La préparation de dérivés phosphorés d'hormones stéroïdes en particulier est intéressante de deux points de vue :

- d'une part pour la vérification des hypothèses biogénétiques sur la conversion des unités isoprèniques en polyterpènes et stéroïdes (1, 2), ou l'identification d'intermédiaires métaboliques de ces produits naturels (3);

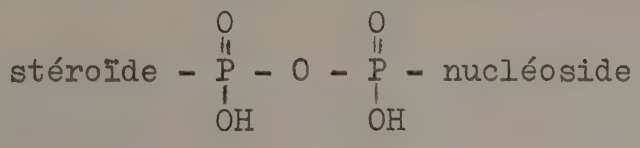
- d'autre part pour leur étude pharmacodynamique: ce sont en effet des dérivés généralement hydrosolubles, et parfois énergétiquement activés, d'hormones ayant une activité physiologique.

Plusieurs phosphates d'hormones stéroïdes ont déjà été préparés (4 - 14), certains sont utilisés en thérapeutique.

Nous décrivons dans cette thèse des préparations nouvelles de plusieurs acides stéroïde-phosphoriques (Chapitre I) et phosphoramidiques (Chapitre II) ainsi que divers autres dérivés et sels de ces acides. La série de la déhydroépiandrostérone a été examinée avec un soin particulier du fait des controverses soulevées au sujet de son phosphate.

Le troisième Chapitre est consacré à l'étude d'une série de méthyl-phosphonates de stéroïdes.

La préparation d'esters pyrophosphoriques dissymétriques contenant simultanément une molécule de stéroïde et une molécule d'un nucléoside, suivant le schéma :



nous paraissait particulièrement intéressante, bien qu'il soit difficile de prévoir quel genre d'activité physiologique de tels corps pouvaient présenter.

Ces pyrophosphates d'un type nouveau, et que nous appellerons "stéroyl-nucléotides"(15), pourraient aussi être une forme métabolique ou un moyen de transfert de l'hormone engagée. Signalons à ce propos que OERTEL et EIK-NES ont récemment isolé, dans le plasma du sang humain, des fractions complexes contenant simultanément la déhydroépiandrostérone et l'acide phosphorique (16).

Notre but était, non seulement de mettre de tels composés en évidence dans le produit d'une réaction (Chapitre IV), mais aussi de les préparer en quantité suffisante pour permettre une étude physique, chimique et pharmacodynamique complète.

Le problème de la synthèse des coenzymes et des acides nucléiques a entraîné la mise au point de nombreuses méthodes nouvelles de condensation d'esters phosphoriques en pyrophosphates (pour une revue de ces méthodes voir (17) et (18). Nos premiers essais, employant les phosphoramidates, étudiés par TODD (19), puis KHORANA (20), nous ont permis de préparer et d'isoler un corps de cette nouvelle série, mais de sérieuses difficultés sont apparues dès que nous avons tenté de transposer la méthode, et surtout la séparation chromatographique utilisée, à l'échelle du décigramme. De plus les rendements étaient faibles. Nous avons donc été amenés, dans le cas précis de la synthèse de l'acide P_1-oestrone, P_2-adénosine pyrophosphorique, à étudier systématiquement les conditions expérimentales des réactions et à comparer entre elles les diverses méthodes de condensation en esters pyrophosphoriques dissymétriques proposées ces dernières années. Nous avons obtenu les meilleurs résultats en préparant d'abord le pyrophosphate P_1-oestrone, P_2-diphényle puis en déplaçant l'acide diphényl-phosphorique

par l'acide adénylique dans ce pyrophosphate. Nous avons appliqué cette méthode à la préparation de plusieurs autres stéroyl-nucléotides.

La nécessité de séparer et de caractériser sans ambigüité les produits obtenus, nous a amené à développer parallèlement au travail de synthèse les méthodes physiques d'identification et d'analyse qui s'appliquent le plus efficacement à cette classe de substances. Ceci situe un autre aspect de ce travail.

Ainsi la spectrographie infra-rouge se prête bien à l'étude des méthyl-phosphonates d'une série de stéroïdes différents alors que la mesure du dichroïsme circulaire confirme la structure des différents dérivés phosphorés d'un même stéroïde. Les pK de plusieurs acides stéroyl-phosphoriques et phosphoniques ont été mesurés, parfois dans le milieu méthylcellosolve/eau, et ont pu servir à étayer des considérations théoriques. Les phosphomorpholidates ont été caractérisés par leur spectre de résonance magnétique nucléaire (R.M.N.).

Nous nous sommes attachés aussi à trouver un moyen de "suivre" chaque réaction entreprise. L'analyse de mélanges d'acides phosphoriques par chromatographie sur couche mince de silice après méthylation des hydroxyles acides libres par du diazométhane, directement sur la plaque, fournit l'exemple d'une méthode d'analyse, de contrôle et d'identification nouvelle que nous avons utilisée à cet effet.

Le dernier chapitre de ce travail décrit l'application de la R.M.N. des esters méthyliques à la caractérisation des acides organo-phosphoriques. Nous en dégageons une méthode de dosage particulièrement utile dans le cas où la nature des substituants rend le dosage acidimétrique impossible. La position des signaux dus aux groupes méthoxyles donne de précieuses indications sur la nature des autres substituants.

Nous décrivons aussi un dédoublement secondaire nouveau des signaux dus aux méthoxyles portés par le phosphore, attribuables à l'encombrement stérique au voisinage du phosphore. L'étude de ce phénomène nous a amené à préparer également les méthyl-phosphonates de quelques terpènes.

CHAPITRE I

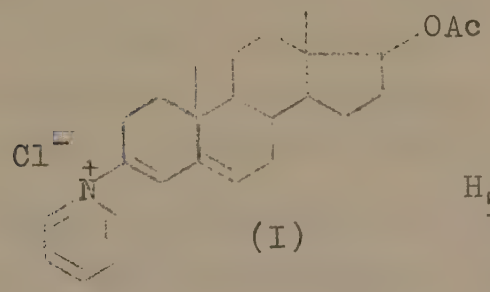
PHOSPHATES DE STEROÏDES

La phosphorylation directe des stéroïdes par l'oxychlorure de phosphore dans la pyridine n'a pas toujours donné les résultats escomptés. EULER et BERNTON, les premiers, font réagir ce réactif sur le cholestérol et obtiennent respectivement le mono- et le diester phosphorique suivant qu'ils ajoutent la solution de stéroïde à l'oxychlorure ou inversent l'ordre d'addition (21). PLIMMER et BURCH préparent les mêmes produits, toujours dans la pyridine, en suivant un mode opératoire différent, mais ne peuvent reproduire la préparation du phosphate de dicholestéryle selon EULER et BERNTON. Ils préparent par contre un "phosphate de tricholestéryle" par action de PCl_5 sur le cholestérol (22). VENNER confirme les résultats des premiers, mais ne réussit pas à préparer le phosphate de tricholestéryle des seconds, dont l'encombrement stérique rend d'ailleurs l'existence improbable(23). WAGNER-JAUREGG, lui, pense que les produits obtenus par EULER et BERNTON sont respectivement des pyrophosphates de di- et de tétra-cholestéryle et propose pour leurs sels de sodium des structures d'orthopyrophosphates pour expliquer leur formation difficile (24).

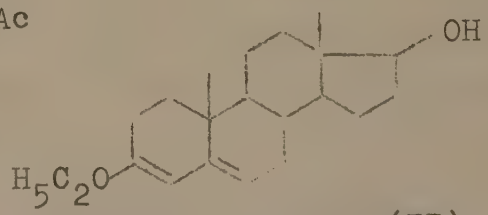
La formation de composés d'addition du phosphate de cholestéryle avec la pyridine, du type C_5H_5N, $2ROP(O)(OH)_2, H_2O$(25) ou 2 C_5H_5N, 2 ROP (O) $(OH)_2$ (23) a été reconnue. D'autres "sels particls" de ce type ont été décrits avec le sodium (24,26,27) ou la quinoléine (28) ou l'acridine (27). L'existence de tels composés rend l'isolement des phosphates délicat et diminue notablement les rendements. De plus ils ont pu être à l'origine de diverses confusions car les points de fusion et les compositions centésimales de certains de ces composés sont très proches de ceux des phosphates libres, comme le montre clairement VENNER (23). Nous avons repris les modes opératoires de ce dernier dans le

cas du cholestérol et nous confirmons ses résultats mais nous n'avons pas pu transposer la préparation du diester dans la série, pourtant très analogue, de la déhydroépiandrostérone.

MULLER et al. obtiennent le composé (I) en faisant agir l'oxychlorure de phosphore dans la pyridine à température ordinaire sur l'acétate de testostérone; pour préparer le phosphate en 17 ils protègent la cétone conjuguée en préparant l'éther d'énol (II).



(I)



(II)

A priori la phosphorylation par l'oxychlorure de phosphore dans la pyridine ne permet donc pas d'espérer la formation d'un produit de réaction unique. On attend d'abord un mélange de mono et de diester phosphorique dont les proportions respectives dépendront du mode opératoire choisi. La formation possible de composés d'addition avec la pyridine vient compliquer le problème. Dans certains cas on a observé la déshydratation du stérol et on a isolé l'éther; cette réaction peut devenir prépondérante dans le cas de l'ergostérol (23). La formation de dienes par déshydratation de 3-hydroxy, Δ_5-stéroïdes peut également être envisagée. Enfin la solvolyse du composé d'addition du phosphate de monocholestéryle et de la pyridine par HCl conduirait au 3β-chlorocholestène-5 (23). Ce sont les raisons qui ont incité les auteurs à se tourner vers des méthodes de phosphorylation plus douces et plus sélectives. Les réactifs proposés sont des anhydrides ou des chlorures de diesters ou de

phosphoramidates; ils réagiront avec les hydroxy-stéroïdes en donnant des triesters ou des phosphoramidates estérifiées; on éliminera ensuite les groupes protecteurs par hydrolyse ou hydrogénolyse. On a ainsi utilisé les mono- et dichlorures d'anilidophosphoryle (29), le dichlorure de diphénylamidophosphoryle (30) et le pyrophosphate de tétrabenzyle (8). Utilisant le chlorure de diphénylphosphoryle, TURNBULL et al. pensaient préparer le phosphate de cholestéryle d'une manière plus satisfaisante que ses prédécesseurs après hydrolyse alcaline du diphénylphosphate de cholestéryle (31), mais reconnaissent n'avoir obtenu l'hydrolyse que d'un seul phényle, tous les efforts faits pour se débarrasser du second étant restés vains (25). Plus récemment ces auteurs ont proposé l'emploi du chlorure de dimorpholyle-phosphoryle mais la méthode ne s'est pas révélée aussi sélective qu'on le prévoyait (32).

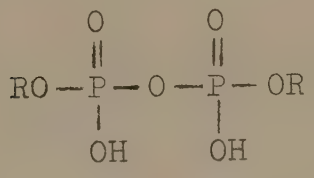
VENNER a introduit dans le domaine des stéroïdes le chlorure de dibenzyle-phosphoryle largement utilisé par TODD (23, 13).

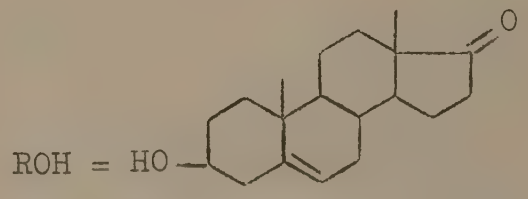
Cette revue situe le problème que nous abordons. Il était logique de tenter d'abord la phosphorylation par l'oxychlorure de phosphore, quitte à faire appel à une autre méthode au cas où elle ne donnerait pas satisfaction. Si, par contre, le rendement de la phosphorylation directe était satisfaisant il devenait alors indispensable de caractériser le phosphate isolé sans ambiguïté. Par rapport à nos prédécesseurs nous disposions de moyens analytiques nouveaux : méthodes chromatographiques plus efficaces, et méthodes spectrales plus puissantes.

I. ACIDE DEHYDROEPIANDROSTERONE-PHOSPHORIQUE

En 1958 OERTEL et GROESCHEL (12) décrivaient un phosphate de déhydroépiandrostérone obtenu en faisant agir $POCl_3$ sur la déhydroépiandrostérone.

Une autre préparation, par BAULIEU et al. obtenue également par phosphorylation directe, s'est révélée différente de celle d'OERTEL. BAULIEU et al. publièrent alors une note critique du travail précédent dans laquelle ils décrivent leur phosphate, démontrent que le produit d'OERTEL ne peut être le phosphate de déhydroépiandrostérone attendu et proposent pour sa structure celle du pyrophosphate (14)

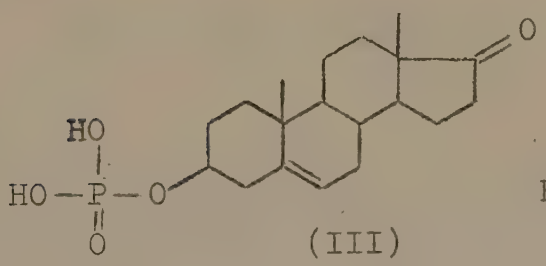




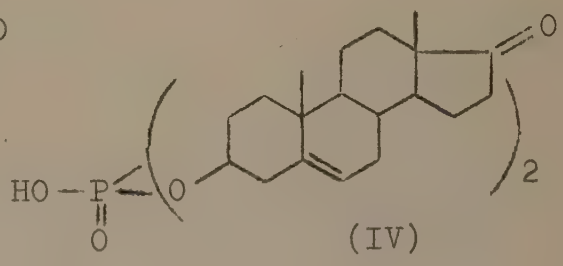
Nous reprenons l'étude de la phosphorylation directe par $POCl_3$ et complétons ce travail.

A) Phosphorylation de la déhydroépiandrostérone par l'oxychlorure de phosphore

Nous avons préparé le phosphate de déhydroépiandrostérone (III) en traitant le stéroïde par un excès d'oxychlorure de phosphore à froid, dans la pyridine anhydre. L'hydrolyse du dichlorure de déhydroépiandrostérone phosphoryle qui se forme ainsi conduit, en suivant le mode opératoire précis que nous discuterons plus loin, au phosphate attendu avec d'excellents rendements.



(III)



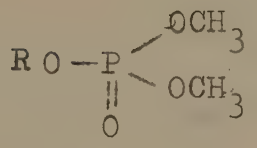
(IV)

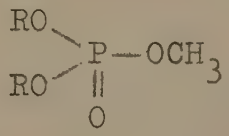
La recherche du meilleur mode opératoire exigeait la mise au point d'un moyen d'analyse simple et rapide des mélanges réactionnels bruts.

La chromatographie sur papier des phosphates de stéroïdes est peu satisfaisante à ce point de vue, car tous les solvants essayés ne nous ont donné que des taches allongées et généralement mal séparées. La chromatographie sur couche mince de silice permet d'autre part de suivre rapidement la disparition de l'hydroxy-stéroïde au cours de la phosphorylation mais ne permet pas de discerner les divers produits acides formés, qui restent adsorbés sur la ligne de départ.

Nous atteignons le but proposé en portant le mélange à examiner sur une chromatoplaque de silice et en traitant directement le spot obtenu par une solution éthérée de diazométhane,

sur la plaque même, avant son développement. Nous avons constaté en effet que le mélange des esters méthyliques des divers acides phosphoriques plus ou moins substitués formés au cours de la réaction était très bien séparés sur chromatoplaque. Les principales taches ainsi séparées ont été identifiées avec les esters (V) et (VI).





ROH = déhydroépiandrostérone

Cette nouvelle méthode d'analyse nous a permis d'examiner rapidement et sûrement les nombreuses variantes opératoires que nous discuterons maintenant; d'autres développements de cette méthode seront examinées p. 23 et dans le chapitre VI.

Il est important et logique, contrairement au mode opératoire utilisé par OERTEL (d'après GENSLER (9)), d'ajouter lentement la solution de stéroïde à la solution d'oxychlorure de phosphore de manière à ce que le stéroïde à phosphoryler soit toujours en présence d'un excès de $POCl_3$, ceci pour éviter la formation du diester (IV). Pour la même raison la vitesse d'addition doit être très lente. Nous opérons à 0°: à cette température la formation de produits de déshydratation n'est pas encore sensible, mais une température plus basse ralentit la réaction et favorise de ce fait la formation du diester.

Il faut noter aussi que les meilleurs résultats sont obtenus lorsque l'on utilise des solutions concentrées des deux réactifs. Nous opérons, contrairement à BAULIEU et al., avec un excès (2 équivalents) d'oxychlorure de phosphore, en solution

concentrée et en utilisant pour seul solvant la pyridine.

Nous avons examiné de nombreuses autres variantes opératoires. L'éther, l'acétone ou le dioxane anhydres ont été utilisés comme solvants. La présence d'une base est nécessaire; deux bases de forces très différentes, la pyridine et la triéthylamine, ont été employées et donnent des résultats comparables. Des solutions de concentrations différentes ont été essayées. On a également fait varier la proportion des réactifs ainsi que la vitesse et l'ordre de leur addition.

L'analyse chromatographique des esters méthyliques, pour toutes les variantes expérimentées, n'a montré, outre la présence éventuelle de déhydroépiandrostérone n'ayant pas réagi, que les deux taches correspondant aux esters (V) et (VI) et initialement aux acides (III) et (IV); seuls varient le rendement de la phosphorylation et la proportion relative des deux esters.

Reprenant en particulier la méthode de OERTEL nous avons obtenu, en suivant exactement le mode opératoire qu'il propose, un mélange des deux esters d'où nous avons isolé un phosphate de déhydroépiandrostérone identique au nôtre et différent de celui qu'il décrit!

L'acide déhydroépiandrostérone-phosphorique est facilement isolé par extraction au bicarbonate de sodium. L'acide libre est précipité en ajoutant de l'acide chlorhydrique, filtré, lavé et recristallisé dans le méthanol aqueux.

Le rendement est de 85 à 94 %.

Trois faisceaux de résultats nous ont permis de lever toute incertitude sur la structure du produit que nous avons préparé :

- préparation du même phosphate par des méthodes de phosphorylation sélectives et douces.

- étude du mécanisme de la réaction et caractérisation du dichlorure de stéroyl-phosphoryle intermédiaire.

- examen du produit et de ses dérivés par diverses méthodes physiques.

B) Phosphorylation de la déhydroépiandrostérone par le chlorure de dimorpholyle-phosphoryle

Le chlorure de dimorpholyle-phosphoryle réagit avec les alcools comme le chlorure d'un monoacide et ne permet plus qu'une seule substitution. Ce réactif a été proposé par MONTGOMERY et TURNBULL pour la facilité avec laquelle on pense pouvoir hydrolyser les groupes morpholyles en milieu acide (32). On peut cependant craindre que la réactivité du phosphor-dimorpholidate (VII) obtenu ne permette des substitutions ultérieures.

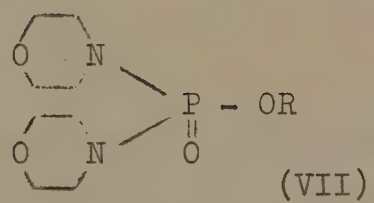
Nous avons préparé le réactif en faisant agir $POCl_3$ sur la morpholine anhydre, puis nous l'avons soigneusement distillé (32). La déhydroépiandrostérone a été dissoute dans la pyridine anhydre et additionnée de deux équivalents de chlorure de dimorpholyle-phosphoryle. L'effet électro-donneur des groupes morpholyles se traduit par une très nette diminution de la réactivité de ce chlorure d'acide par rapport à l'oxychlorure de phosphore, aussi est-il nécessaire de travailler à 80°.

On peut contrôler la réaction aisément par chromatographie sur couche mince de silice. On dénombre ainsi huit substances dans le produit brut de réaction, dont trois s'y trouvent en proportions importantes.

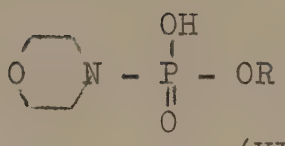
La séparation des constituants du mélange réactionnel brut a été réalisé par chromatographie sur colonne d'alumine. On élue le dimorpholylophosphate de déhydroépiandrostérone (VII) par de l'éther. Ce produit sera décrit au chapitre II.

Sur le spectre infra-rouge d'une fraction mineure suivante on reconnaît la présence du groupe morpholino et d'un P = O entièrement estérifié à 1260 cm^{-1}. Une bande intense à 944 cm^{-1} (pyrophosphate) suggère pour ce produit la formule (IX); il serait dû à la condensation des composés (VII) et (VIII).

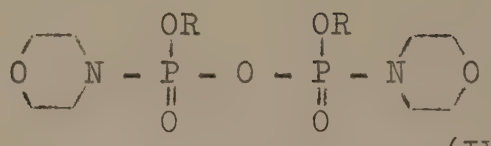
Une fraction plus importante (143 mg), éluée par le méthanol a été identifiée à l'acide (VIII), décrit au chapitre II, qui se forme par hydrolyse partielle de (VII) pendant la réaction.



(VII)



(VIII)



(IX)

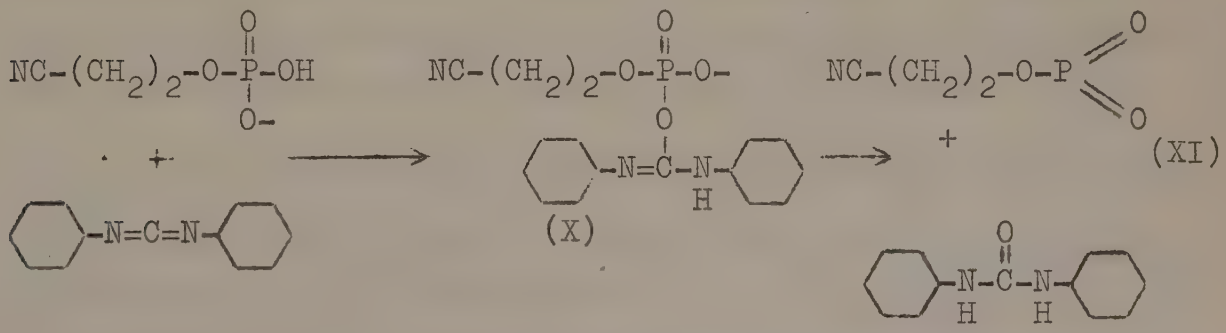
Le dimorpholinophosphate de déhydroépiandrostérone est hydrolysé en phosphate (III) en milieu HCl dilué.

C) Phosphorylation de la déhydroépiandrostérone par le phosphate de 2-cyanoéthyle en présence de dicyclohexylcarbodiimide (DCC)

La préparation d'un diester phosphorique à partir d'un alcool et d'un monoester en présence de (DCC) est facile. On disposera donc d'un bon moyen de phosphorylation si le groupe alkyle du monoester employé peut être éliminé par une hydrolyse spécifique douce.

TENER propose ainsi le phosphate de cyano-éthyle pour la phosphorylation de nucléosides sensibles aux acides (33), le groupe cyano-éthyle est en effet hydrolysable en milieu alcalin par un mécanisme de β-élimination (34, 35). Plusieurs auteurs l'ontutilisé après TENER dans ce domaine (36), et les résultats obtenus nous ont incité à l'essayer sur un stéroïde.

La méthode est sélective. En effet, le phosphate de cyano-éthyle, en présence de DCC, donnerait un intermédiaire activé (X), puis le métaphosphate (XI) qui serait le véritable agent phosphorylant (82). La réaction, de par son mécanisme même, ne peut donc pas dépasser le stade du diester. Ce diester est un acide trop fort pour que l'on puisse craindre la condensation ultérieure d'une nouvelle molécule de phosphate de cyano-éthyle pour donner un pyrophosphate triestérifié.



(XI) + ROH ⟶ NC-(CH$_2$)$_2$-O-P(O)(OR)-OH (XII) $\xrightarrow{OH^-}$ RO-P(O)(OH)-OH (III)

ROH = déhydroépiandrostérone.

Nous avons obtenu le 2-cyanoéthyl-phosphate de déhydro-épiandrostérone (XII) en traitant la déhydroépiandrostérone par 2 équivalents de phosphate de 2-cyanoéthyle et 10 équivalents de DCC dans la pyridine anhydre. La réaction se fait à température ordinaire; le rendement est de 78 %.

Le spectre infra-rouge de ce produit présente une bande très faible à 2260 cm^{-1} dans la région des fréquences de vibration du groupe -C≡ N. Cette bande n'est pas plus intense dans le spectre du produit où la fonction acide encore libre est méthylée. De nombreux exemples sont donnés où la vibration du -C≡N est masquée au point de disparaître complètement dans des molécules contenant de l'oxygène (37).

On reconnaît encore dans ce spectre: à 1740 cm^{-1} la bande du carbonyle en 17, à 1235 cm^{-1} la vibration du phosphoryle P=O; et vers 1030 cm^{-1} celle, très forte, des liaisons P-O-C. Ces bandes se retrouvent inchangées dans le spectre du dérivé méthylé sauf celle de P=O qui est nettement déplacée vers les fréquences plus faibles; il s'y ajoute, à 1188 cm^{-1}, une petite bande attribuable à $P-O-CH_3$.

Le déplacement de la fréquence de vibration du phosphoryle vers les basses fréquences proviendrait de la formation de liaisons hydrogène inter-moléculaires. BELLAMY et BEECHER (38) ont confirmé l'existence d'une telle association dans les spectres de nombreuses substances contenant les groupes $-P\overset{O}{\underset{OH}{}}$. Nous avons observé pour notre part un déplacement de 35 à 70 cm^{-1} sur 19 exemples lorsque l'on passe des acides aux esters méthyliques correspondants.

Le 2-cyano-éthyl-phosphate de déhydroépiandrostérone est un monoacide fort.

Nous le caractérisons encore par le spectre R.M.N. de son

dérivé méthylé (voir Chapitre VII), reproduit sur la Figure 1, sur lequel on reconnaît: les méthyles en 18 et 19 et le proton vinylique du stéroïde; le groupe cyano-éthyle montre un triplet pour le méthylène portant le nitrile (δ = 166 cps, J = 6 cps) et un quadruplet à 256 cps pour le méthylène lié au phosphore (dédoublement d'un triplet par le phosphore avec J_{H-P} = 8,5 cps); enfin l'amplitude du signal du méthoxyle, à 228 cps, dédoublé par le phosphore (J = 11,5 cps) confirme le dosage électrométrique et la masse moléculaire.

Le groupe cyano-éthyle est hydrolysé par NaOH N à 100° en 20 min. L'hydrolyse a été suivie par chromatographie sur plaque de silice, après traitement des spots par le diazométhane (p. 22), illustrant ainsi une autre application de cette méthode. Le produit brut de l'hydrolyse a été recristallisé et identifié aux autres préparations du phosphate de déhydroépiandrostérone obtenues par les méthodes précédentes.

Cette méthode de phosphorylation, appliquée ainsi pour la première fois aux stéroïdes, est douce, efficace, et d'une réelle sélectivité, contrairement à la phosphorylation par le chlorure de dimorpholyle-phosphoryle qui conduit à une variété de produits, et nécessite de ce fait une séparation chromatographique délicate pour ne donner finalement que de faibles rendements. Cette dernière méthode requiert des conditions expérimentales sévères, surtout pour l'hydrolyse des groupes protecteurs, ce qui limite son emploi.

D) Caractérisation du dichlorure de déhydroépiandrostérone-phosphoryle

Deux mécanismes peuvent être invoqués pour expliquer la phosphorylation des alcools par l'oxychlorure de phosphore :

Dans le premier (a) les atomes de chlore pourront être substitués successivement par des groupes divers, en particulier par des alcools pour donner finalement des triesters, dans la mesure où l'encombrement stérique ne joue pas.

Le second mécanisme (b) fait appel à des métaphosphates hypothétiques monomères (XV) et (XVI). Ces intermédiaires sont généralement admis dans le cas des phosphorylations par des monoesters phosphoriques activés décrits au Chapitre V ; ils conduisent finalement à un diester et ne permettent pas de dépasser ce stade de substitution. TODD a suggéré l'intervention de ces métaphosphates pour expliquer une amélioration du rendement de la phosphorylation par $POCl_3$ observée dans certaines cas en présence de très faibles quantités d'eau (39, 40).

a) $O{=}P(Cl)_3 \xrightarrow{ROH} O{=}P(O\text{-}R)Cl_2$ (XIII) $\xrightarrow{ROH} O{=}P(O\text{-}R)_2Cl$ (XIV) $\xrightarrow{ROH} O{=}P(O\text{-}R)_3$

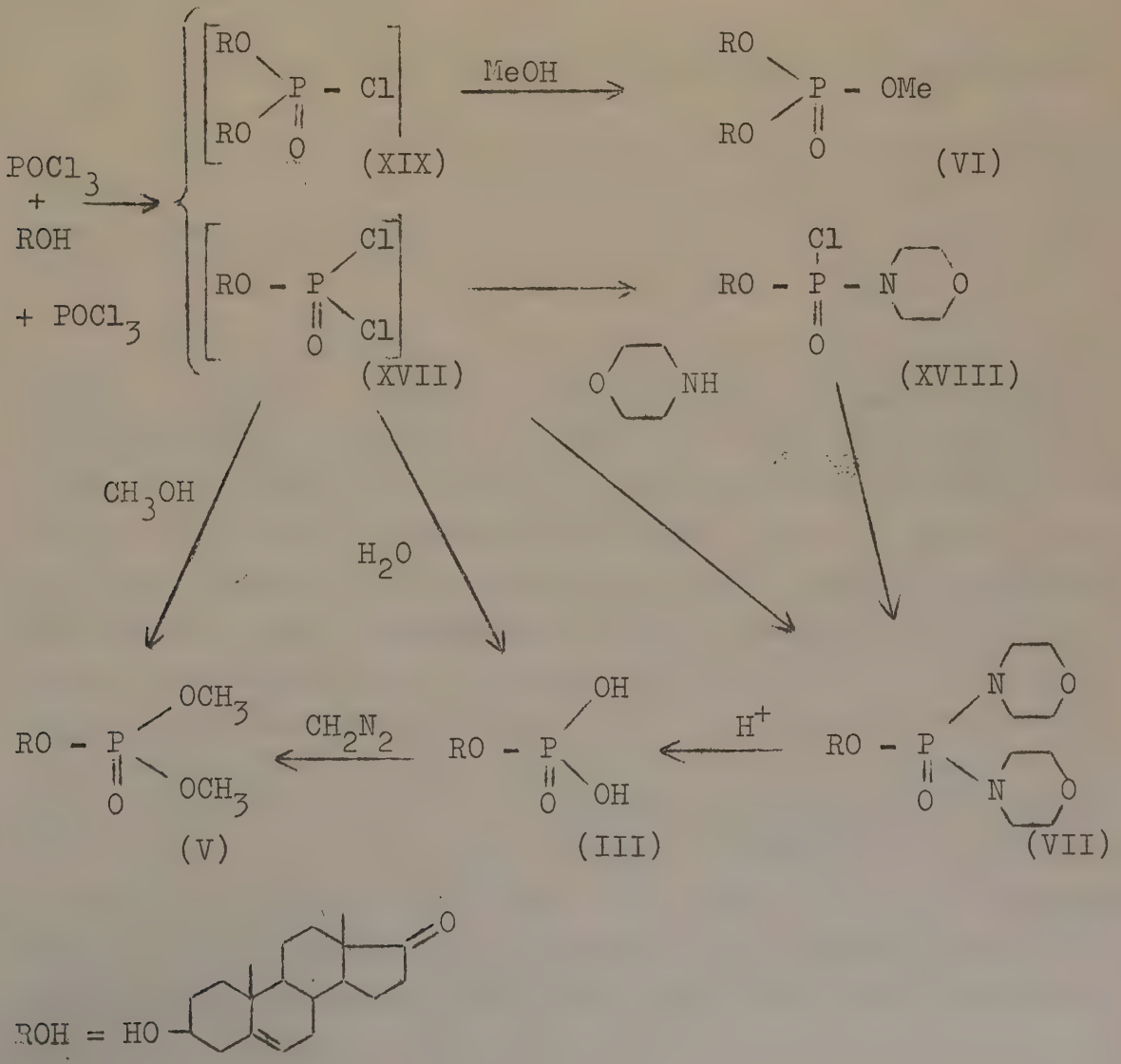
b) $Cl_3P{=}O \xrightarrow{H_2O} Cl\text{-}P(=O)(=O) \xrightarrow{ROH} Cl\text{-}P(OH)(=O)\text{-}O\text{-}R$ + 2ClH (XV)

$Cl\text{-}P(OH)(=O)\text{-}O\text{-}R \longrightarrow R\text{-}O\text{-}P(=O)(=O)$ (XVI) $\xrightarrow{ROH} R\text{-}O\text{-}P(OH)(=O)\text{-}O\text{-}R$ + HCl

Le dichlorure de stéroyl-phosphoryle envisagé pour le premier mécanisme a été isolé dans le cas du cholestérol (21,23). Nous n'avons pas pu isoler celui de la déhydroépiandrostérone: le précipité qui se forme pendant la réaction et que nous avons séparé ne contient que le chlorure de pyridinium ou de triéthylammonium, suivant la base utilisée, et quelque soit le solvant.

Mais nous prouvons que la phosphorylation se fait suivant le premier schéma dans les conditions où nous travaillons: nous avons préparé à cet effet, à partir du mélange réactionnel brut anhydre, plusieurs dérivés du dichlorure XVIII) (Tableau I).

TABLEAU I



Si, au lieu de l'hydrolyser pour obtenir le phosphate, on l'alcoolyse en ajoutant un excès de méthanol anhydre au mélange réactionnel qui le contient, on obtient le diester méthylique (V) de l'acide (III). Ce diester est identique à celui que l'on obtient en méthylant l'acide (III) par le diazométhane.

Lorsque l'on traite le mélange réactionnel par un excès de morpholine on retrouve le dimorpholinophosphate (VII) décrit précédemment.

Enfin, en faisant réagir le mélange réactionnel avec une quantité limitée de morpholine nous avons pu préparer et isoler le chlorure de l'acide déhydroépiandrostérone morpholinophosphorique (XVIII).

Ces deux dérivés seront décrits dans le chapitre II.

Seul le mécanisme (a) est compatible avec la formation de ces trois dérivés. Si l'intermédiaire réactif avait été le métaphosphate (XVI) on aurait obtenu l'ester monométhylique (XXII) (p. 27) et l'acide morpholinophosphorique (VIII).

En présence d'un ou deux équivalents d'eau pour 2 équivalents de $POCl_3$ et un équivalent de déhydroépiandrostérone nous avons observé, en traitant le mélange obtenu par du méthanol anhydre, la formation d'une certaine proportion des deux esters (V) et (VI), ce qui prouve que la réaction s'est au moins partiellement déroulée suivant le mécanisme a). Si l'on traite ce mélange brut, après méthanolyse, par du diazométhane sur la plaque de chromatographie, on observe une augmentation d'intensité du spot correspondant au triester (V) et, dans une proportion beaucoup moindre, de celui du triester (VI). Ceci suppose que la quasi-totalité de l'acide bis-déhydroépiandrostérone-phosphorique se trouvait encore sous forme de son chlorure (XIX) à la fin de la phosphorylation. La présence des esters (V) et (VI) suppose aussi la formation au moins partielle du dichlorure intermédiaire (XVIII). Les produits acides qui, après traitement au méthanol,

restent sur la ligne de départ, peuvent aussi provenir de la phosphorylation par des produits d'hydrolyse partielle de l'oxychlorure de phosphore (41). Rappelons à ce propos que l'anhydride de l'acide dichlorophosphorique a été utilisé pour la phosphorylation de nucléotides (42). Il faut noter que l'on n'observe pas de taches supplémentaires sur la chromatoplaque si la phosphorylation est faite en présence d'eau; de telles taches pourraient traduire la formation éventuellement possible de pyrophosphates ou de polymétaphosphates.

Pour 4 équivalents d'eau, dans les mêmes conditions, la réaction est totalement inhibée.

E) Caractérisation de l'acide déhydroépiandrostérone-phosphorique

Nous avions à identifier et à comparer entre eux les acides préparés suivant les différentes méthodes décrites précédemment.

La mesure des points de fusion ne constitue pas un critère valable car le point de fusion varie d'une préparation à l'autre suivant le degré d'hydratation de la molécule, et ceci dans des limites larges (14). Les points de fusion de mélanges n'offrent pas davantage de critère significatif.

Les spectres infra-rouges, s'ils permettent de reconnaître les principales fonctions, ne permettent souvent pas de distinguer des molécules de structure par ailleurs différentes. Les spectres des mono- et diesters phosphoriques ont tous un aspect commun: les bandes d'absorption des liaisons P=O et P-O-C y apparaissent en massifs peu résolus. Seuls les triesters présentent des empreintes digitales fines.

En chromatographie sur papier, les phosphates de stéroïdes donnent des taches allongées; les mono-et diesters sont souvent mal séparés.

Nous avons mis au point un test d'identification simple et rapide des esters phosphoriques basé sur la préparation de leurs esters méthyliques.

Pour tous les esters phosphoriques que nous avons étudiés, il a été aisé de méthyler avec du diazométhane toutes les fonctions acides encore libres sur le phosphore, même lorsque leur encombrement stérique est important. Il en est résulté deux méthodes d'étude:

A) Pour de faibles quantités de substances, par chromatographie:

Environ 0,1 mg des deux phosphates à comparer sont portés en un même point sur la ligne de départ d'une chromatoplaque de silice, on traite ensuite directement le spot obtenu avec une solution éthérée de diazométhane ajoutée à l'aide d'une pipette effilée puis on développe la plaque dans un mélange acétate d'éthyle/benzène (30/70). On révèle par pulvérisation d'acide sulfurique et on observe une ou deux taches suivant que les acides initiaux sont identiques ou non.

Cette méthode est rapide et sûre, elle s'est révélée utile tout au long de ce travail, non seulement pour l'identification de deux produits mais aussi pour "suivre" l'évolution d'une phosphorylation ou l'hydrolyse d'un produit (p. 17) ou pour l'analyse qualitative d'un mélange brut de réaction (p.34).

B) Si l'on dispose d'une quantité de substance plus importante, par spectrographie :

On traite environ 25 mg du phosphate, en solution dans le chloroforme (faire éventuellement les spectres I.R. et R.M.N. sur cette solution)par du diazométhane dissous dans de l'éther froid jusqu'à coloration jaune persistante et on évapore à sec. Le résidu pourra être examiné successivement en I.R. et en R.M.N. Les spectres I.R. des triesters sont plus riches en bandes fines et leur comparaison plus significative. L'intégration des signaux

dus aux méthyles en R.M.N. constitue un dosage des fonctions acides (Chapitre VI). Enfin les triesters non hydratés, ont des points de fusion plus nets que les acides dont ils dérivent.

Remarque: La méthode A) se trouve en défaut si les deux acides à comparer ne diffèrent que par un groupe méthoxyle porté par le phosphore, c'est pourquoi, dans la méthode B, il est important de prendre le spectre R.M.N. sur le produit avant méthylation si cette éventualité est possible.

Cette étude des dérivés méthylés, appliquée au phosphate de déhydroépiandrostérone a permis de conclure à l'identité des diverses préparations et de caractériser le produit comme un diacide phosphorique. Les données spectrales sont rassemblées dans le tableau III. Cette structure est confirmée par le dosage électrométrique en solution méthylcellosolve/eau (80/20) (43) et donne pour pK_{MCS} 4,15 et 9,72 (Figure 3).

La partie stéroïdique de la molécule reste inchangée comme le prouvent le spectre U.V. et la mesure du dichroïsme circulaire.

II. ACIDE BIS-DEHYDROEPIANDROSTERONE-PHOSPHORIQUE

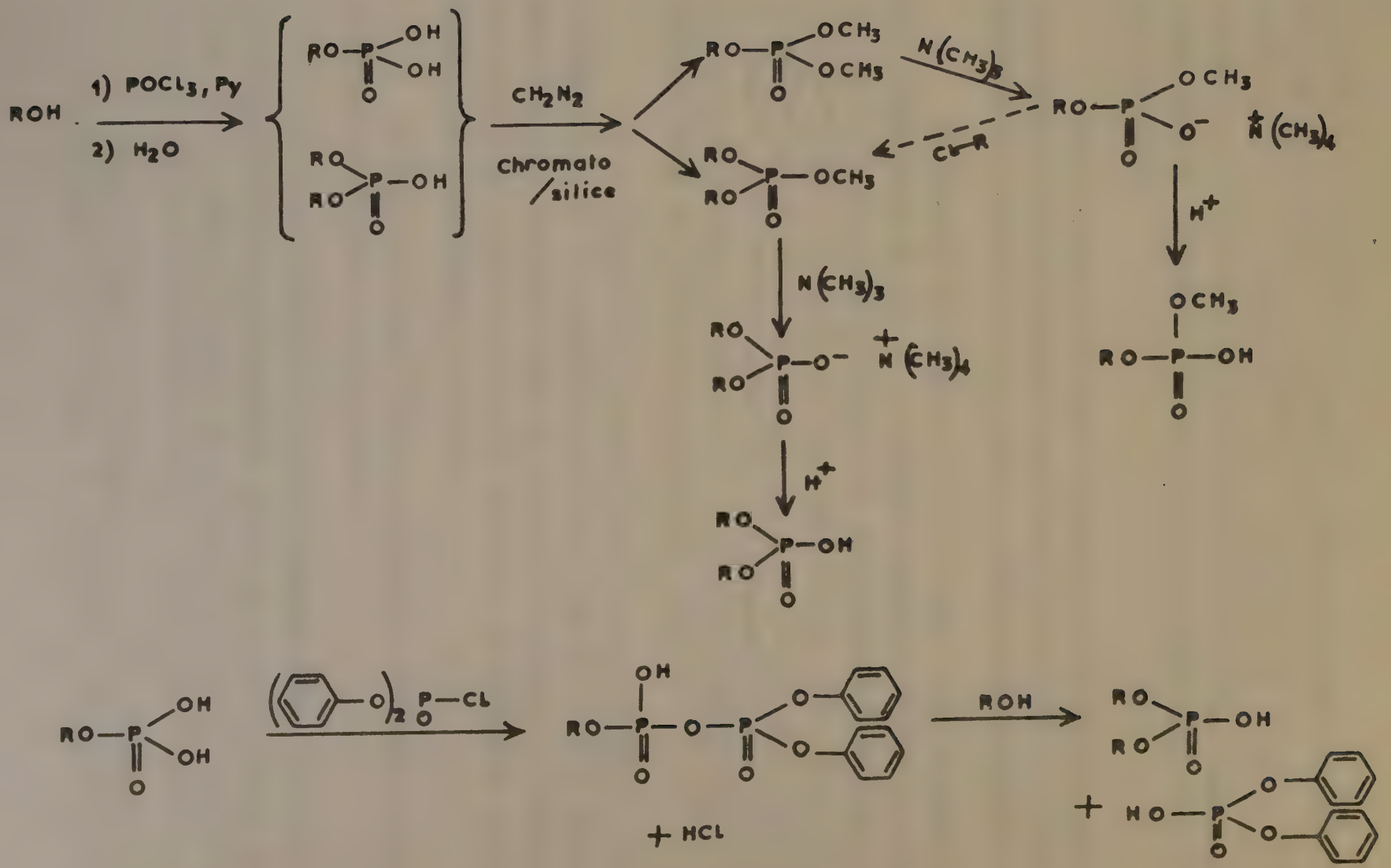
Le produit secondaire de la réaction de phosphorylation directe de la déhydroépiandrostérone par l'oxychlorure de phosphore devait être l'acide bis-déhydroépiandrostérone-phosphorique (IV). Pour confirmer cette hypothèse il fallait isoler ce corps dans le produit d'une phosphorylation ou le préparer par une voie indépendante. Il était intéressant aussi de le comparer au "phosphate" de OERTEL.

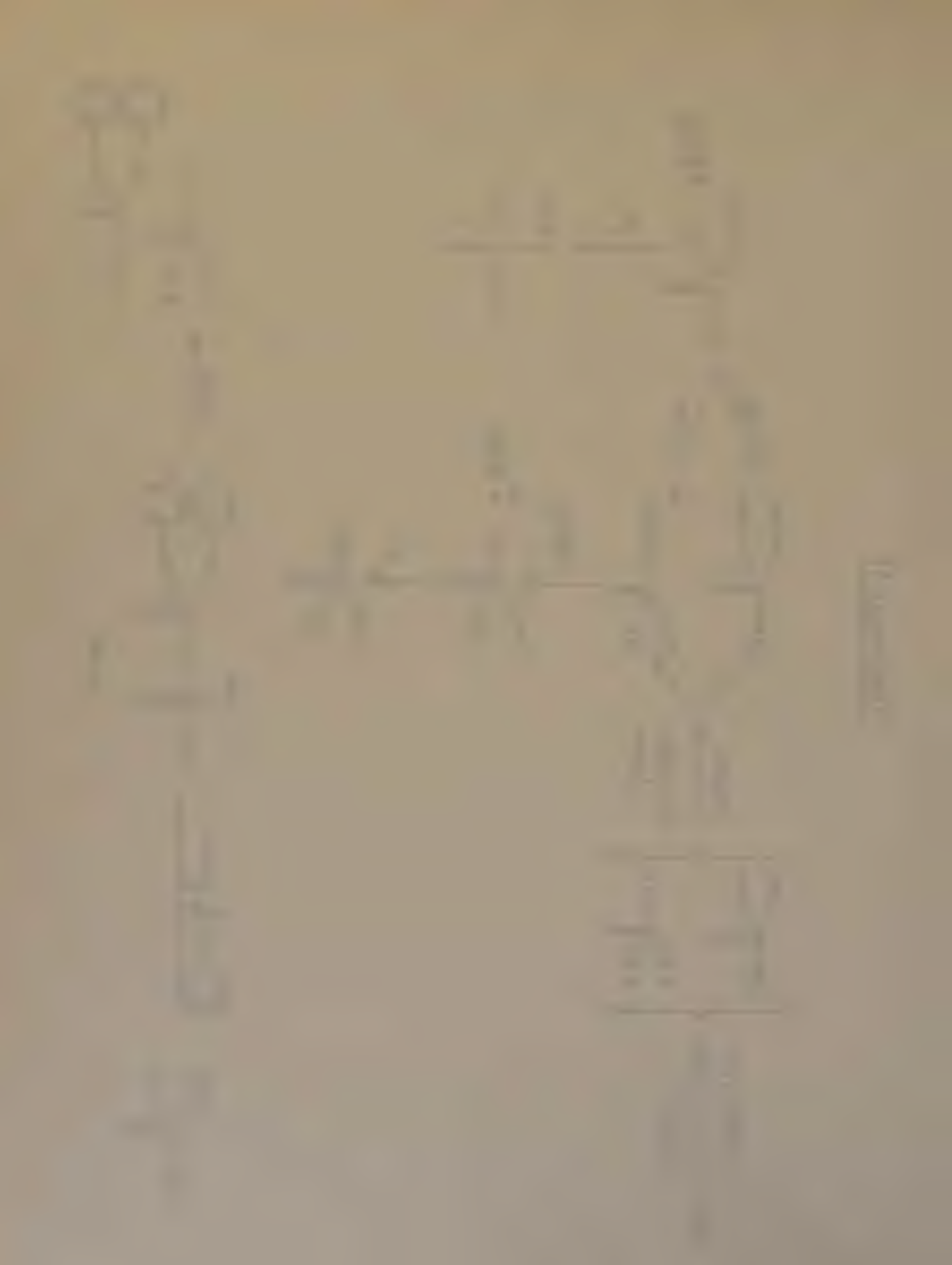
Nous avons d'abord tenté la préparation de ce diester en ajoutant lentement une solution d'oxychlorure de phosphore dans une solution du stéroïde comme le fait VENNER dans le cas du cholestérol (23). Le diester se forme dans une proportion de 40 à 60 %, mais nous n'avons pas pu le séparer à l'état pur bien que, peu soluble dans une solution de bicarbonate de sodium, il se rassemble en partie à l'interface des phases si l'on traite le brut de réaction de la même manière que pour isoler l'acide déhydroépiandrostérone-phosphorique. Le produit séparé par filtration apparaît encore comme un mélange des deux acides (III) et (IV) même après plusieurs recristallisations. L'acide déhydroépiandrostérone-phosphorique obtenu en acidifiant la phase aqueuse est de son côté fortement souillé de diester.

Un autre accès au diester peut se faire par déplacement de l'anion diphényl-phosphorique par l'hydroxy-stéroïde dans le pyrophosphate P_1-déhydroépiandrostérone, P_2-diphényle (XXIII). La réaction sera étudiée au chapitre V. Ici encore nous n'avons pu obtenir que des mélanges contenant environ 40 % du diester attendu.

La séparation des acides (III) et (IV) n'ayant pas pu être faite directement, nous l'avons entreprise par le biais de leurs esters méthyliques (V) et (VI). Pour cela le mélange des acides isolés dans les produits des réactions précédentes est méthylé exhaustivement par une solution de diazométhane dans l'éther. Nous avons alors pu séparer les esters obtenus de manière satisfaisante par chromatographie sur colonne de silice. Le premier

Tableau II





produit élué présente en R.M.N. un groupe méthoxyle dont le signal est dédoublé avec le couplage de II cps attendu avec le phosphore (chapitre VI); l'intégration donne un groupe CH_3-O-P pour deux molécules de stéroïde. Le second produit élué est identique au phosphate de déhydroépiandrostérone et de diméthyle (V) préparé par ailleurs.

Nous avons isolé dans une fraction de tête un produit cristallisé (4 % du mélange porté sur la colonne; F = 154°) que nous avons identifié au chlorure de déhydroépiandrostérone (44).

Le passage de l'ester (VI) à l'acide (IV) se fait par l'intermédiaire du sel de tétraméthylammonium (XX). La désalkylation d'un ester phosphorique par quaternarisation d'une amine tertiaire est une réaction bien étudiée (45, 46). Elle n'est possible que si le phosphate ne porte pas de charge négative et se limite ainsi d'elle-même à une monodéalkylation. CHABRIER et ses collaborateurs ont montré que le groupe méthyle pouvait être déplacé avec une facilité particulière (47).

Nous avons traité l'ester (VI), dissous dans de l'acétone anhydre, par de la triméthylamine en excès. Le sel de tétraméthylammonium est insoluble dans ce milieu et commence à précipiter au bout d'une à deux heures. La réaction est complète après deux jours à la température ordinaire.

Le diester acide (VI) est obtenu en traitant le sel de tétraméthylammonium par HCl dilué.

La forte proportion d'ester diméthylique de l'acide déhydroépiandrostérone-phosphorique isolée au cours de cette préparation nous a incité à tenter la synthèse de l'acide bis-déhydroépiandrostérone-phosphorique par une autre voie (Tableau II).

Traité par la triméthylamine en milieu acétonique anhydre, l'ester diméthylique (V) donne le sel (XXI) qui précipite cristallisé.

En milieu acide le sel (XXI) donne l'acide méthyl, déhydro-épiandrostérone-phosphorique (XXII).

En présence de chlorure de déhydroépiandrostérone (44), nous pouvions espérer obtenir l'ester méthyl, bis-déhydroépian-drostérone-phosphorique (VI) (48), à partir duquel nous savons déjà passer à l'acide (V). Mais nous n'avons pas pu, jusqu'à présent, mettre de condensation en évidence et nous envisageons de reprendre cette réaction en substituant le bromure de déhydro-épiandrostérone au chlorure trop peu réactif.

III. AUTRES ACIDES STEROÏDE-PHOSPHORIQUES

Nous avons appliqué le mode opératoire et les méthodes analytiques mis au point pour la phosphorylation directe de la déhydroépiandrostérone par l'oxychlorure de phosphore, à la préparation des acides stéroïde-phosphoriques employés dans la suite de ce travail et en particulier des acides oestrone- et testostérone-phosphoriques, dont la préparation par d'autres voies était décrite.

Les hydroxy-stéroïdes, convenablement protégés par ailleurs si nécessaire, sont dissous dans la pyridine anhydre; la solution est refroidie à 0° puis ajoutée lentement à deux équivalents de $POCl_3$ dissous dans la pyridine également refroidie.

Le dichlorure de stéroïde-phosphoryle qui se forme quantitativement est ensuite hydrolysé. La pureté des acides isolés est contrôlée comme décrit p.22 .

L'acide oestrone-phosphorique (XXIV) a été préparé par TODD et ATHERTON. Ces auteurs font agir l'acide tétrabenzyl-pyrophosphorique sur le dérivé sodé de l'oestrone, puis hydrogénolysent les groupes benzyliques (8) (Fdt 84 %).

Par notre méthode le rendement est de 90 à 100 %.

Nous avons préparé de même l'acide testostérone-phosphorique (XXV) (5, 9) et l'acide 19nor-testostérone-phosphorique (XXVI) sans rencontrer de difficultés particulières.

L'acide oestradiol-phosphorique-3 (XXVII) avait déjà été obtenu par phosphorylation directe du propionate en 17 d'oestradiol par $POCl_3$ dans la pyridine à -10° (6, 7).

IV. PROPRIETES PHYSIQUES DES ACIDES STEROIDE-PHOSPHORIQUES

Les données numériques relatives aux acides stéroïde-phosphoriques sont rassemblées dans le tableau III. Les acides stéroïde-phosphoriques présentent deux acidités, l'une forte, l'autre moyenne. Les pK indiqués ici représentent les pH, aux points de demi-neutralisation des deux acidités, mesurés dans l'eau, sur des solutions $\frac{M}{200}$, dans des conditions identiques. La méthode de dosage des acides carboxyliques en solution dans le méthylcellosolve (MCS) et l'eau (80/20), mise au point par SIMON (43), peut être appliquée aux acides phosphoriques insolubles ou peu solubles dans l'eau.

Les courbes de dosage électrométrique des acides oestrone-phosphorique et testostérone-phosphorique sont représentées sur la figure 3; on y a joint la courbe de neutralisation de l'acide déhydroépiandrostérone-phosphorique en milieu MCS/eau, les pK^*_{MCS} sont alors définis comme les pH aux points de demi-neutralisation des acides dans ce milieu (43). Notons l'effet du noyau phénolique qui, dans l'acide oestrone-phosphorique, se traduit par un net renforcement de l'acidité.

Le spectre ultra-violet de l'acide oestrone-phosphorique montre par rapport à celui de l'oestrone (ε = 2300 à 280 mμ), un déplacement du maximum -dédoublé- vers les courtes longueurs d'onde et un net abaissement du coefficient d'extinction moléculaire (ε = 1200 à 270 mμ). Cet effet s'explique, comme dans le cas de l'acétate en C-3 (ε = 1040 à 260 mu) (49) et du méthylphosphonate (ε = 1120 à 270 mu) (Chapitre III), par la diminution due au phosphore électronégatif, de la conjugaison des électrons p de l'oxygène phénolique avec les électrons π du noyau. On retrouve les mêmes effets hypsochrome et hypochrome dans le cas de l'acide oestradiol 3-phosphorique. Les spectres ultra-violets des autres acides décrits correspondent à ceux des stéroïdes non phosphorylés.

En infra-rouge tous les acides stéroïde-phosphoriques que nous avons étudiés ont une forte bande d'absorption vers 1230 cm^{-1} attribuée à la vibration de valence de P=O (50).

Les courbes de dispersion rotatoire et de dichroïsme circulaire des stéroïdes ne sont pas modifiées par la phosphorylation

Les acides stéroïde-phosphoriques sont légèrement solubles dans l'eau; très solubles dans le tampon à pH 7 et dans le méthanol.

Nous complétons la caractérisation de ces acides par celle de leurs esters méthyliques. Nous avons reconnu dans ces derniers des dérivés dont la préparation est aisée et non ambigüe (voir p. 22), faciles à purifier (chromatographie sur silice ou alumine) et dotés de propriétés spectrales très caractéristiques (Tableau IV).

Dans l'infra-rouge les phosphates entièrement estérifiés donnent des spectres plus lisibles - bandes plus fines - que ceux des acides correspondants; on y reconnaît vers 1030 cm^{-1} la bande généralement attribuée à la vibration de valence de P)- O - C et à 1190 cm^{-1} une bande faible mais de position constante caractéristique du groupe P - O - CH_3 (57). La fréquence de vibration de la liaison P=O y est supérieure de 40 à 45 cm^{-1} à celle des acides non méthoxylés (voir p. 16).

En R.M.N. les méthoxyles liés au phosphore se reconnaissent au couplage avec le phosphore (J = 11 cps) (Fig. 2), la position des signaux dépend des autres substituants portés par le phosphore (Tableau XVIII), enfin l'intégration des pics constitue un dosage assez précis (à $\pm$ 5 %) des méthyles et permet de dénombrer les hydroxyles acides portés par le phosphore dans l'acide non méthylé L'étude des esters méthyliques par R.M.N. sera développée au chapitre VII.

Fig. 1

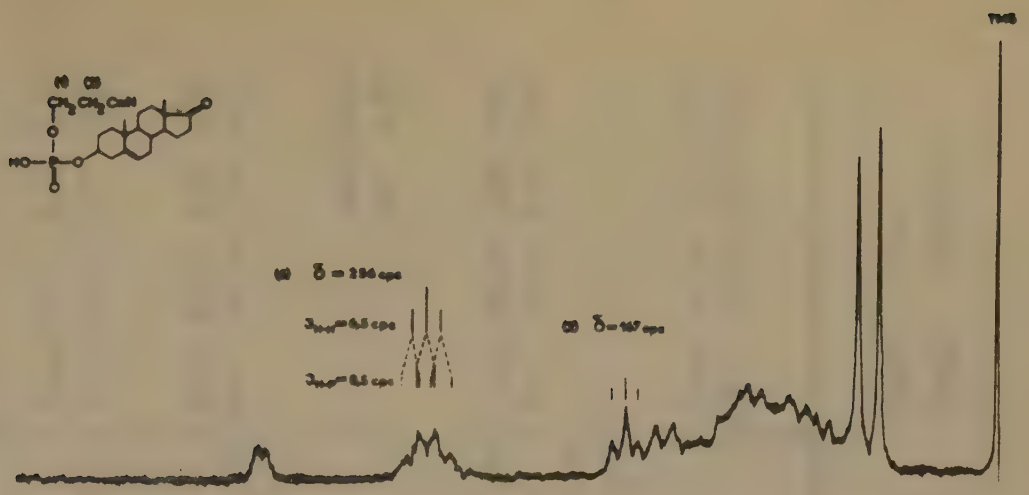


Fig. 2

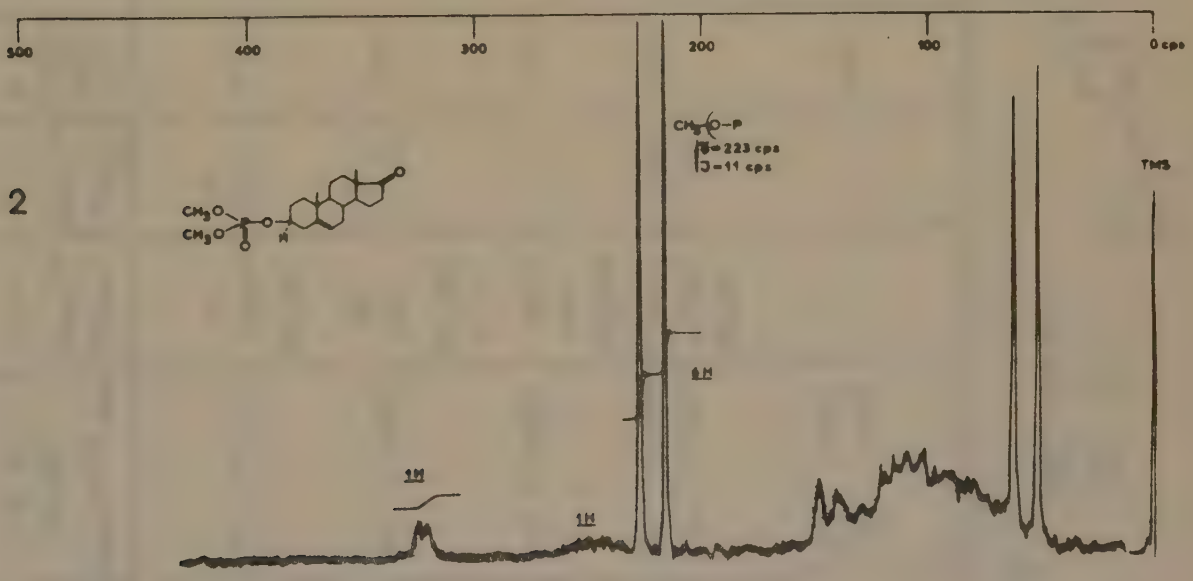


Fig. 3

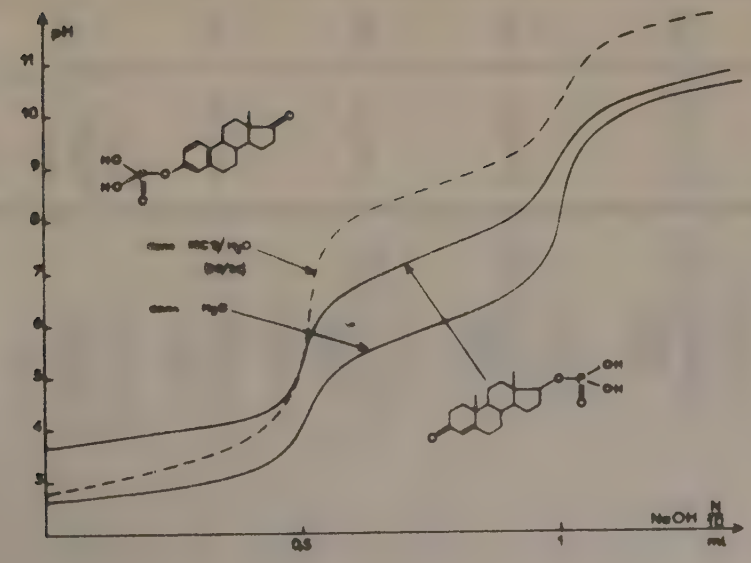
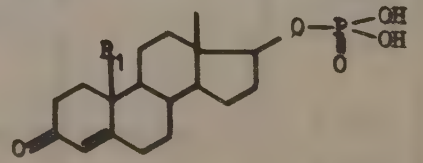


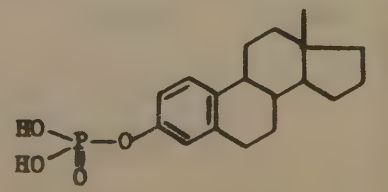
TABLEAU III.

ACIDES STEROIDE-PHOSPHORIQUES	F	Rdt %	$[\alpha]_D$ (CH_3OH)	U. V. (CH_3OH) λ_{max} (mμ) ε_{max}	D. R. λ_{max} (mμ) $[\alpha]_{max}$	D. C. λ_{max} (mμ) (Tampon) $\Delta\varepsilon$	I. R. (KBr) ν(P=O) cm^{-1}	Acidité pK_1 pK_2	Analyses	C	H	P
III	mal défini (14)	85	13°	290 (47,5)	315 +1480° (CH_3OH)	292 +3,23	1225	4,15 9;72 (MCS/H_2O)	Calc:	61,95	7,93	8,40
$C_{19}H_{29}O_5P$ = 368,40									Tr:	62,04	7,71	7,91
XXV	140-141	97		241 (16400)	350 -340° (CH_3OH)	305 -1,78	1227	4,05 7,35 (H_2O)	Calc:	59,05	8,08	8,01
$C_{19}H_{29}O_5P,1H_2O$ = 386,40									Tr:	58,82	8,10	8,15
XXVI	132-134	92		240 (18200)	342,5 -342° (CH_3OH)		1225		Calc:			8,79
$C_{18}H_{27}O_5P,1H_2O$ = 372,38									Tr:			8,53
XXIV	214-215	98	129°	270 (1220) 276 (1100)	312,5 +2306° (EtOH)	290 +3,85	1230	2,87 5,98 (H_2O) 3,25 8,65 (MCS/H_2O)	Calc:	58,69	6,85	8,42
$C_{18}H_{23}O_5P,1H_2O$ = 368,38									Tr:	58,46	6,78	8,42
XXVII	245-246	82		270 (1085) 276 (980)			1230		Calc:	61,36	7,15	8,79
$C_{18}H_{25}O_5P,1H_2O$ = 370,38									Tr:	61,14	7,10	8,77



XXV $R_1 = CH_3$

XXVI $R_1 = H$



XXIV: 17-oxo

XXVII: 17-hydroxy

TABLEAU IV

ESTERS METHYLIQUES	F	Analyse P Calc.% Tr.	D.C. λ max (mμ) (Dioxane) $\Delta\varepsilon$	I.R. cm^{-1} ($CHCl_3$) P = O	P)-O-C	P)-O-Me	R.M.N. ($CDCl_3$) CH_3-O-P δ	J.	n(CH_3O)	δ H (Cycl
dhea - P(=O)(OCH$_3$)(OCH$_3$)	152-154°	7,82 7,74	303 +3,06	1270	1036 (massif)	1188	223	11	1,92	247
dhea dhea > P(=O) - OCH$_3$	210-212°	5,00 4,60	303 +6,17	1272	1035	1188	224	11,5	0,94	248
dhea — P(=O)(OCH$_3$)(OCNCH$_2$CH$_2$O)		7,35 7,70	304 +2,94	1272	1035		228	11,5	1,0	
dhea (C$_6$H$_4$O) > P(=O) - OCH$_3$		6,97 7,12		1268	1068	1195	231	11,5	0,94	257
dhea (O, N) > P(=O)-OCH$_3$			304 +2,79	1253	(massif)	1186	222	11,5	-	248
dhea HO > P(=O) - OCH$_3$	165-166°	8,07 8,35	303 +2,95	(1250 (1265	1034	1190	223	11	1,06	246
oestrone-P(=O)(OCH$_3$)(OCH$_3$)	136-138	8,18 8,30	301 +3,52 ($CHCl_3$)	1275	1055	1190	232	11,5	2,1	
testostérone-P(=O)(bOCH$_3$)(OCH$_3$)		7,82 7,70	332 -1,29 (3 pics)	1272	1040	1190	221 (CCl_4)	11	1,88	260
cholestérol cholestérol > P(=O)-OCH$_3$	159-161	3,64 4,03	-	1270	1030		223	11	0,98	248

dhea = déhydroépiandrostérone

CHAPITRE II

PHOSPHORAMIDATES DE STEROÏDES

Le caractère hautement énergétique de la liaison P-N (3,51) fait des phosphoramidates des corps susceptibles d'activité biologique, et aussi susceptibles de servir d'intermédiaires réactifs dans la synthèse des esters pyrophosphoriques dissymétriques. Les phosphoramidates sont à la base d'une fructueuse méthode de condensation comme nous le verrons au chapitre V.

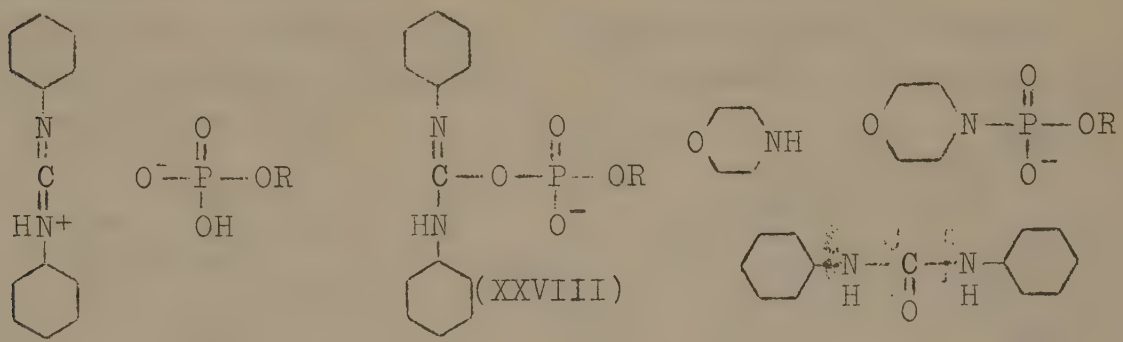
La première préparation du phosphoramidate d'adénosine faisait appel à une longue série de réactions conduisant à un rendement global faible (52). Une méthode plus simple et générale a été décrite par CHAMBERS et MOFFAT (53). Le phosphoramidate d'adénosine, obtenu par cette méthode sous forme de son sel de dicyclohexyl-1,3-guanidinium, a l'inconvénient de n'être que très peu soluble dans la pyridine généralement utilisée comme milieu réactionnel. KHORANA et ses collaborateurs ont montré que les phosphomorpholidates présentaient sur les phosphoramidates le double avantage d'une meilleure solubilité et d'une plus grande réactivité (54, 55).

Nous avons obtenu avec un bon rendement l'adénosine-phosphoramidate de dicyclohexyl-1,3 guanidinium par condensation directe du nucléotide non protégé avec l'ammoniac, en présence de DCC, suivant CHAMBERS et MOFFAT.

Mais nous avons surtout préparé des phosphomorpholidates en série stéroïde, résolvant par la même occasion le problème de la solubilité de ces dérivés.

I. PHOSPHOMORPHOLIDATES D'OESTRONE

La condensation de la morpholine et de l'acide oestrone-phosphorique en présence de DCC est rapide à 80°. On utilise comme solvant un mélange de t-butanol et d'eau. La réaction est quantitative dans ces conditions ainsi qu'en témoigne l'analyse chromatographique sur papier.

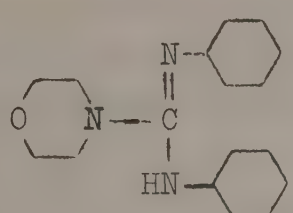


(XXVIII)

ROH = oestrone

La réaction est possible à froid, mais n'est complète qu'après trois jours à température ordinaire. L'examen du mélange réactionnel à intervalles réguliers montre que le passage de l'acide oestrone-phosphorique (Rf 0,64) au phosphomorpholidate (Rf 0,94) se fait par l'intermédiaire d'un troisième produit (Rf 0,85). Ce produit est peut-être le composé d'addition présumé de l'acide oestrone-phosphorique sur le DCC (XXVIII).

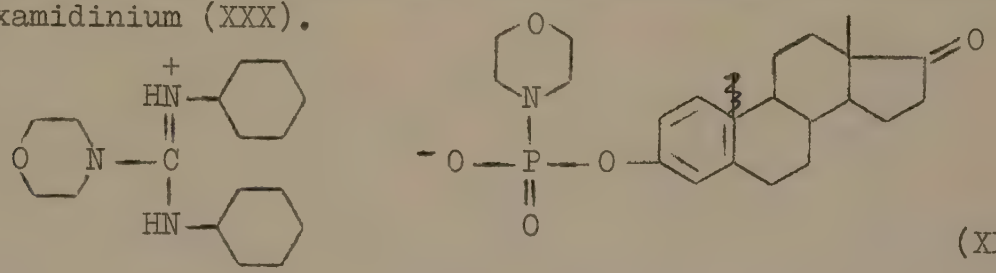
On filtre la dicyclohexylurée formée, puis on évapore le mélange réactionnel à sec. On peut alors, par addition de quelques ml d'eau, faire apparaître un produit cristallisé en quantité variable suivant les essais. Ces cristaux (F. 104-105°) ne présentent pas d'absorption dans l'ultra-violet et ont un test de Zimmermann négatif. Nous avons caractérisé ce produit comme étant la C-morpholino N,N'-dicyclohexylcarboxamidine (XXIX) formée par addition directe de la morpholine sur le DCC.



(XXIX)

Le point de fusion, le point de fusion de mélange et le spectre infra-rouge prouvent son identité avec la carboxamidine obtenue lorsque la réaction est menée dans les mêmes conditions en l'absence d'acide oestrone-phosphorique.

Pour isoler le phosphoramidate nous avons d'abord filtré la dicyclohexylurée puis extrait la carboxamidine à l'éther. La phase aqueuse est lyophilisée, laissant un résidu contenant l'oestrone-phosphomorpholidate de C-morpholino N,N'-dicyclohexyl carboxamidinium (XXX).



(XXX)

Ce produit brut présente une seule tache révellable au test de Zimmermann en chromatographie sur papier et contient 84 % du phosphomorpholidate cherché, chiffre calculé sur la base de l'extinction moléculaire de l'oestrone à 270 mμ et pour une masse moléculaire supposée de 713.

Les essais de purification ultérieure ont échoué; le produit n'a pas pu être chromatographié et n'a jamais été obtenu à l'état cristallisé.

Nous avons donc dû employer une voie détournée pour prouver sa structure: nous avons préparé l'oestrone-phosphomorpholidate de morpholinium (983) par action de la morpholine sur le pyrophosphate P_1-oestrone, P_2-diphényle en présence de pyridine (Chapitre VI). Cette méthode permet d'obtenir un sel de morpholinium cristallisé, purifiable par recristallisation.

Ce produit a été entièrement caractérisé.

La C-morpholino N,N'-dicyclohexylcarboxamidine est une base plus forte que la morpholine; son addition en quantité stoechiométrique à une solution du phosphomorpholidate de morpholinium

et l'élimination aisée de la morpholine volatile, nous ont permis de reconstituer l'oestrone-phosphomorpholidate de carboxamidinium. Son spectre infra-rouge est identique à celui du produit obtenu par la méthode au DCC.

Nos conclusions, quant à la structure de ce produit, sont en accord avec celles, publiées par MOFFAT et KHORANA, pour des dérivés analogues dans la série des nucléotides (55).

II. PHOSPHOMORPHOLIDATES DE DEHYDROEPIANDROSTERONE

A)Chloro-morpholino-phosphate de déhydroépiandrostérone

Si l'on traite le dichlorure de stéroyl-phosphoryle (XIII), qui se forme lors de la phosphorylation de la déhydroépiandrostérone par l'oxychlorure de phosphore, sans l'isoler du mélange réactionnel, par des quantités croissantes de morpholine, on observe, par chromatographie sur couche mince de silice, la formation successive de deux produits. Le premier produit disparaît en même temps qu'apparaît le second. Ceci correspond au remplacement successif des deux atomes de chlore par un radical morpholyle.

Constatant que le dichlorure passe entièrement sous forme monosubstituée avant que la seconde substitution commence à se faire nous avons cherché à isoler le chloro-morpholino-phosphate (XVIII) intermédiaire. Nous sommes parvenus à séparer les deux stades de la réaction en ajoutant une quantité limitée de morpholine au produit brut de la phosphorylation en présence de triéthylamine et dans des conditions expérimentales précises. Le chloromopholidate se purifie aisément et peut être conservé sans précautions particulières.

L'influence de la substitution d'un chlore par un groupe morpholyle se traduit donc par une nette diminution - prévisible - de la réactivité du chlore restant.

L'addition de morpholine au chloromorpholidate conduit au dimorpholinophosphate de déhydroépiandrostérone (VII). La réaction est rapide: elle peut être faite de manière très simple en traitant un peu de chloro-morpholidate par une goutte de morpholine sur une chromatoplaque de silice. On identifie le produit qui se forme quantitativement au dimorpholidate, en traitant de la même manière un spot témoin portant un mélange du chloromorpholidate et du dimorpholidate: on n'observe qu'une seule tache après développement de la plaque.

Le chloro-morpholidate (XVIII) est hydrolysé en milieu acide et donne l'acide déhydroépiandrostérone-phosphorique (III).

En milieu alcalin dilué on peut limiter l'hydrolyse à l'atome de chlore, on obtient alors l'acide déhydroépindrostérone morpholino-phosphorique (XXXI). Nous en avons préparé l'ester méthylique (XXXII) et le sel de morpholinium (XXXIII) que nous avons identifié au déhydroépiandrostérone phospho-morpholidate de morpholinium obtenu d'une autre manière (§ C). Les propriétés physiques et spectrales de ces corps seront étudiées avec celles des autres phosphomorpholidates à la fin de ce chapitre.

Le chloro-morpholidate se comporte comme un chlorure d'acide mais dont la réactivité est diminuée par la présence sur le phosphore du noyau morpholyle. Il pourra réagir et se condenser avec le sel d'un autre ester phosphorique (voir chapitre V).

B) Dimorpholino-phosphate de déhydroépiandrostérone

Le dimorpholino-phosphate de déhydroépiandrostérone (VII) a été obtenu de trois manières différentes : par action de la morpholine sur le dichlorure de déhydroépiandrostérone-phosphoryle (p. 21), par action du chlorure de dimorpholyle-phosphoryle sur le stéroïde (p. 13) et encore en additionnant la morpholine sur chloro-morpholinophosphate comme décrit ci-dessus.

Les trois produits obtenus sont identiques.

A l'inverse des phosphomorpholidates de carboxamidinium et de morpholinium également décrits dans ce chapitre, le dimorpholidate ne réagit pas avec d'autres esters phosphoriques. Nous n'avons décelé aucune condensation avec AMP dans la pyridine à 80°. Ceci confirmerait l'hypothèse que les phosphomorpholidates doivent pouvoir se mettre sous forme de zwitterions pour réagir (56).

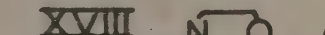
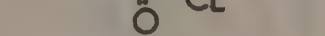
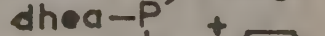
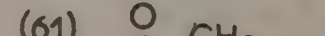
C) Déhydroépiandrostérone-phosphomorpholidate de morpholinium

Une autre voie d'accès aux phosphomorpholidates de stéroïdes est basée sur la réactivité des pyrophosphates trisubstitués

(Chapitre VI, Tableau LXXI).

L'échange de l'anion diphényl-phosphorique par de la morpholine dans le pyrophosphate P_1-déhydroépiandrostérone, P_2-diphényle (XXXIV) donne le déhydroépiandrostérone phosphomorpholidate de morpholinium (XXXIII) qui peut, lui, réagir sous forme de zwitterion et donner de ce fait des réactions de condensation avec d'autres acides (p. 50).

TABLEAU VII

PHOSPHOMORPHLIDATES et sels de morpholinium	F	P % Calc: Tr:	D. C. λ_{max}^{mp} $\Delta\varepsilon$ dioxane	I. R. ($CHCl_3$) cm^{-1} C-N	P=O	$C-O-C$		P-O-C	R.M.N. ($CDCl_3$)		
VII $C_{27}H_{43}O_5N_2P$ = 506,60	204-206°	6,12 6,50	303 +3,56	1260	1232	1114	1136 1092 1068	1036		218 8H	186 8H
XXXII $C_{24}H_{36}O_5NP$ = 451,53			304 +2,79	1250	1235	1102	1123 1086 1060	1048		218 4H	188
XVIII  $C_{23}H_{35}ClO_4NP$ = 455,89	188-190°	6,80 6,95	303 +3,29	1260	1270	1114	1137 1097 1068	1032		222 4H	191 4H
XXXVI dhea-(61)  $C_{24}H_{38}O_4NP$ = 435,53	206-208°	7,11 7,08	303 +3,14	1262	1240	1112	1123 1090 1062	1028		216 4H	183 4H
XXXIV dhea- $C_{23}H_{38}O_6NP$ = 455,51	205-207°	6,81 7,10	2 91 +4,08 (tampon)	massif		1106		massif	238 4H		194 4H
XXXV dhea- $C_{24}H_{40}O_6NP$ = 469,54	187-189°	6,60 6,85	303 +3,05						237 ~4H		187 4H
(61) dhea- $C_{24}H_{40}O_5NP$ = 453,54	193-195°	6 84 6 88	302 +3,15	1270	1240	1106	1090 1065	1030		233 4H	184 4H
XXXIII dhea-  $C_{27}H_{45}O_6N_2P$ = 524,62	169-173°	590 624	303 +290	1260		1100	1128 1068	1038		234 4H	217,5 4H	184 8H
XXXVII oestrone-  $C_{26}H_{39}O_6N_2P$ = 506,56	155-157°	612 617	2 92 +4,14 (tampon)	1255	1233	1105	1067	—		230 4H	212 4H	182 8H

PROPRIETES SPECTRALES

La présence d'un groupe morpholyle dans les composés phosphorés décrits dans ce chapitre se reconnaît sur leur spectre infra-rouge. Le spectre de R.M.N. permet de distinguer facilement les groupes morpholyles liés de manière covalente avec le phosphore des groupes morpholinium dans les sels d'acides phosphoriques; cette méthode permet également de dénombrer ces groupes.

Dans l'infrarouge la morpholine présente un grand nombre de bandes d'absorption dont l'attribution est difficile. La plupart de ces bandes se retrouvent dans les spectres des phosphomorpholidates. Une bande, à 1257 cm^{-1} dans la morpholine, souvent confondue, dans les phosphoramidates, avec la bande de vibration du phosphoryle, est probablement due à la vibration de valence de la liaison C-N (37). Une série de bandes intenses, très caractéristiques, dans l'intervalle de 1137 à 1060 cm^{-1}, se retrouve dans les spectres du dioxane et du tétrahydropyrane: la bande la plus intense dans le tétrahydropyrane a été attribuée à la vibration de la liaison C-O (37). Ce groupe de bandes ainsi que plusieurs autres bandes vers 835 et 805 cm^{-1} dont les empreintes digitales se retrouvent dans tous ces composés et permet leur identification. Les spectres des composés ioniques, sels de morpholinium, sont beaucoup moins bien résolus, on y reconnaît cependant vers 1100 cm^{-1} la bande de valence intense de C-O; nous n'y avons pas retrouvé la bande qui, à 1576 cm^{-1} correspond à la vibration du groupe NH_2^+ dans le chlorure de morpholinium.

On constate que la substitution d'un groupe morpholyle à un hydroxyle sur le phosphore ne modifie pas sensiblement la fréquence de vibration du phosphoryle. Or on sait que la fréquence de vibration de ce groupe dépend dans une large mesure de l'électronégativité de ses substituants (57, 58). Nous donnons dans le tableau VI (colonne a) les positions de la bande phosphoryle dans les spectres de plusieurs dérivés phosphorés de la déhydroépiandrostérone. Nous remarquons un net déplacement de cette bande vers

les hautes fréquences si l'on remplace les méthyles par des phényles (ν = 1290) dans le triester diméthylique (V ; ν = 1270) et vers les basses fréquences si l'on substitue dans ce dernier un groupe méthyle à l'un des méthoxyles (ν = 1242). Le groupe hydroxyle déplace également cette vibration vers les basses fréquences mais d'une manière irrégulière et plus importante que l'électronégativité de ce groupe ne le laisse prévoir; ceci tient probablement à la possibilité pour ce groupe d'établir une liaison hydrogène avec le groupe phosphoryle (38, 57). Les fréquences les plus faibles sont observées pour les acides méthylphosphoriques (Chapitre III) (ν = 1195 cm^{-1}).

Nous constatons donc un étalement de la fréquence de vibration du phosphoryle sur un intervalle de 100 cm^{-1} en fonction des substituants d'un même acide stéroïde-phosphorique. La position de cette bande peut donc orienter ou confirmer la recherche de la structure de ces produits. Il devenait intéressant de situer l'influence du groupe morpholyle parmi celles des autres substituants du phosphoryle.

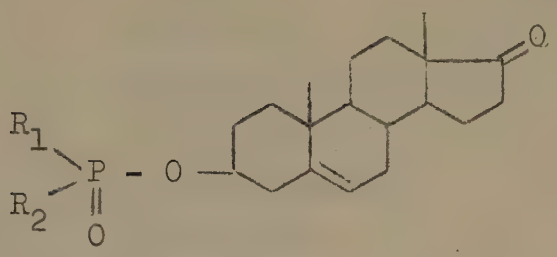
BELL et al. ont donné une relation linéaire entre la position de la vibration du phosphoryle et l'électronégativité des substituants (57). Nous avons tenté de nous servir de cette formule empirique pour calculer la position de cette bande à l'aide des constantes de déplacement additives que donnent ces auteurs aux divers substituants. Les résultats obtenus (tableau VI, colonne b) sont très peu satisfaisants, leur confrontation avec l'expérience permet de constater :

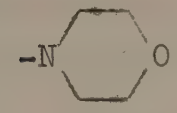
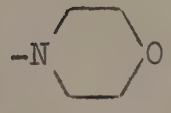
- que les déplacements calculés pour les groupes phényles, méthoxyles et méthyles sont, en l'absence d'hydroxyles, parallèles aux déplacements mesurées, bien que supérieurs à ces derniers.

- que les prévisions sont faussées par la présence d'un hydroxyle; ces auteurs, dont le travail a d'ailleurs été critiqué (50) ne tiennent en effet aucun compte de l'influence certaine des liaisons hydrogènes entre hydroxyle et phosphoryle.

TABLEAU VI

Déplacement de la bande d'absorption de la liaison P=O en fonction des substituants



R_1	R_2	ν(P = O) ($CHCl_3$) (a) valeurs mesurées	(b) valeurs calculées selon Bell et coll. (58)
$-OC_6H_5$	$-OC_6H_5$	1290	1307
$-OC_6H_5$	$-OCH_3$	1268	1298
$-OCH_3$	$-OCH_3$	1270	1290
$-OCH_3$	$-CH_3$	1242	1250
$-OC_6H_5$	-OH	1238	1270
$-OCH_3$	-OH	1265 1250	1262
$-CH_3$	-OH	1197	1222
-OH	-OH	1225	1234
		1232	1290 (1232)
	-Cl	1268	1290 (1262)
	$-OCH_3$	1253	1290 (1262)

Les fréquences indiquées entre parenthèses sont obtenues si l'on prend comme constante de déplacement pour le groupe morpholyle la valeur 2,3

- qu'il n'est pas possible d'utiliser pour la morpholine la constante de déplacement proposée par ces auteurs pour une amine secondaire sans obtenir un écart d'environ 30 cm^{-1} par groupe morpholyle entre les valeurs calculées et les valeurs trouvées. En donnant à cette constante une valeur plus faible (2,3 au lieu de 3) on retrouve les valeurs plus satisfaisantes, indiquées entre parenthèses. La faible électronégativité du groupe morpholyle s'explique par l'influence importante de l'atome d'oxygène dans le cycle, comme d'ailleurs sa basicité réduite (pK = 8,36 contre 11,22 pour la pipéridine (59).

Spectres de résonance magnétique nucléaire.

La morpholine donne en R.M.N. un spectre A_2B_2 dans lequel apparaissent des bandes de conjugaison. Deux groupes de signaux, correspondant aux protons des deux méthylènes en α de l'azote et à ceux des deux méthylènes en α de l'oxygène apparaissent respectivement à 156 et 210,5 cps dans l'eau lourde ($J \simeq 5$ cps). Dans le chlorure de morpholinium, la présence d'une charge positive sur l'azote déblinde les protons sur le carbone en α et, d'une manière moindre ceux du carbone en β. Les fréquences de résonance des deux groupes diminuent et se rapprochent (186,5 et 227 cps), la conjugaison augmente.

Dans le dimorpholino-phosphate de déhydroépiandrostérone (VII), le phosphore électronégatif exerce sur le groupe morpholyle la même influence que la présence d'une charge positive sur l'azote. En déblindant les protons en α de l'azote, il déplace les signaux de ces protons vers les basses fréquences, rapproche les deux groupes de signaux et augmente la conjugaison du système (Fig. 4).

Si l'on considère maintenant le spectre d'un sel de morpholinium (XXXIV, XXXV) on constate que le groupe vibrant aux fréquences les plus élevées n'est guère déplacé et que c'est l'autre massif de bandes qui est le plus affecté lorsque l'on

Fig.4

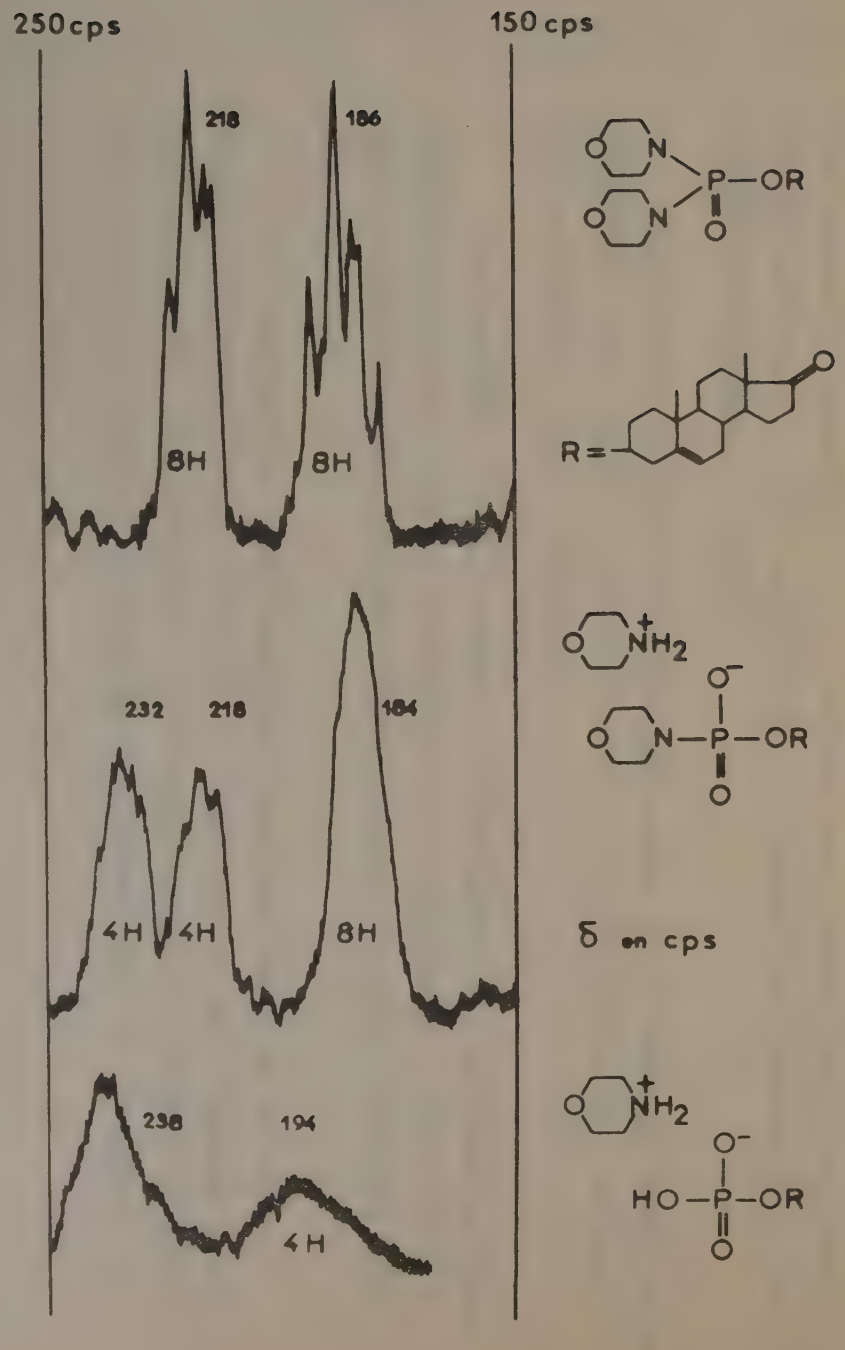
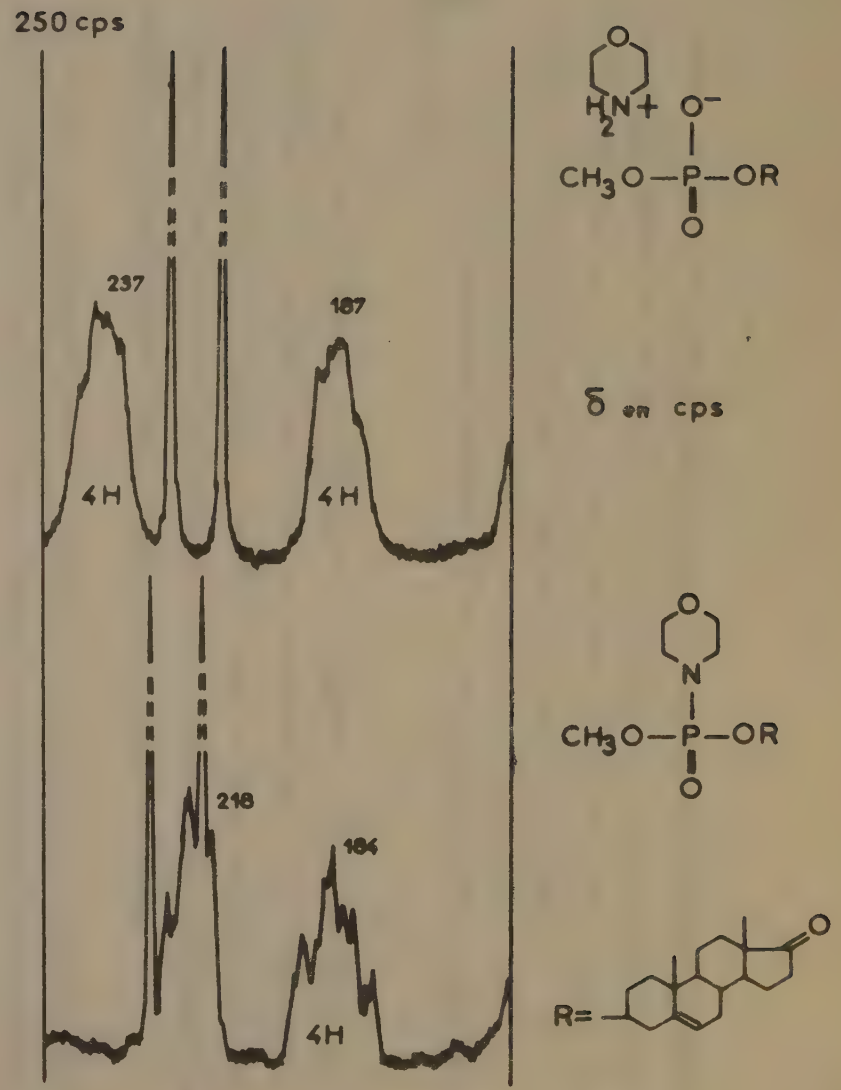
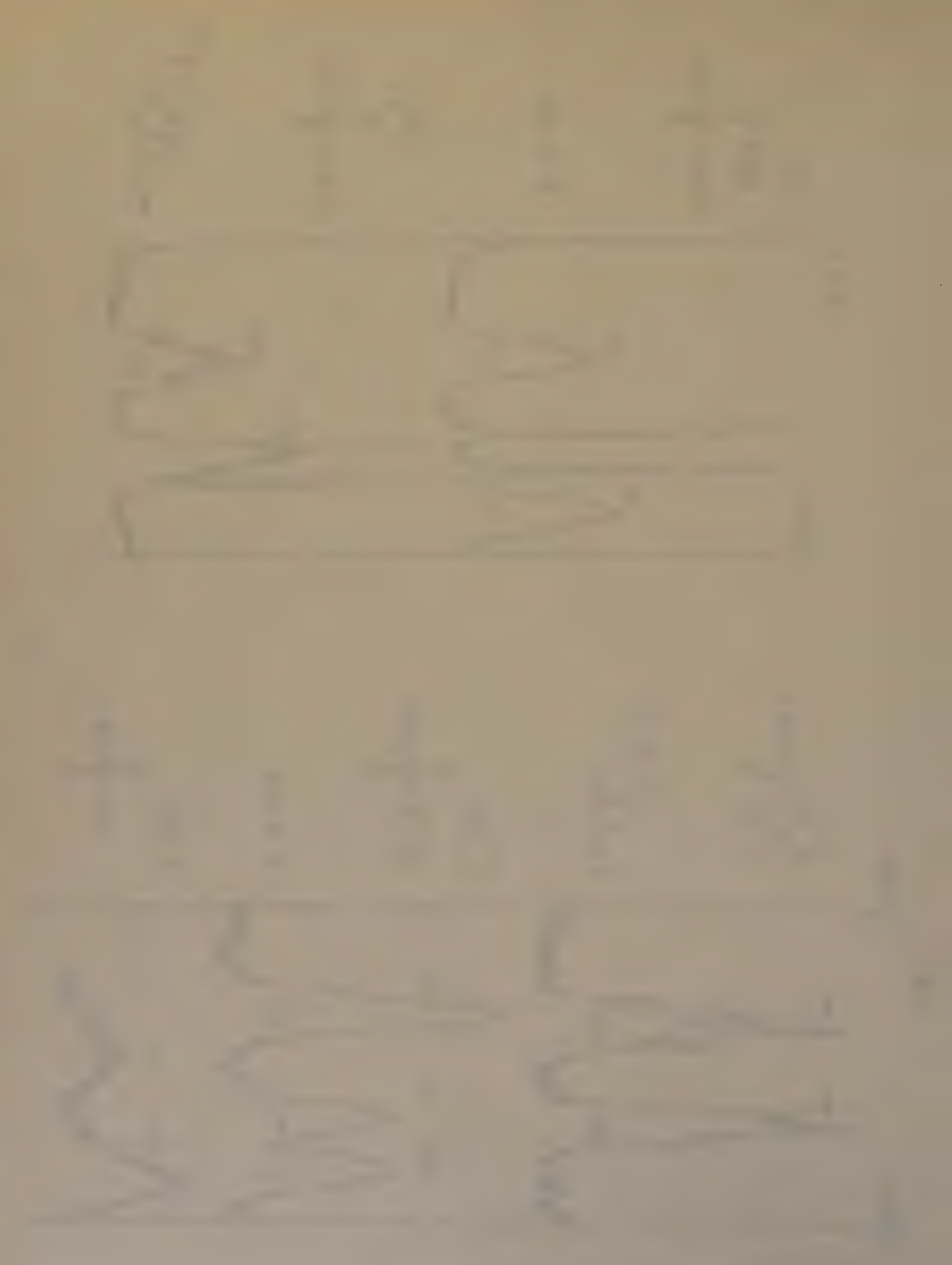

250 cps
150 cps
218
186
8H
8H
232
218
184
4H
4H
8H
238
194
4H
R=
δ en cps
HO—P—OR
HN+
CH3O—P—OR
N
CH3O—P—OR

Fig.5


250 cps
237
187
4H
4H
218
184
4H
δ en cps
R=



passe du groupe morpholyle au groupe morpholinium, L'importance des déplacements relatifs aux deux groupes de signaux est donc l'inverse de celui que l'on observe lorsque l'on passe de la morpholine elle même au chlorure de morpholinium.

Deux hypothèses peuvent être envisagées pour expliquer ces spectres :

ou bien les protons portés par le carbone en α de l'azote sont davantage déblindés que ceux du carbone en α de l'oxygène lorsque l'azote porte une charge positive ou, d'une manière moindre, lorsqu'il est lié au phosphore et il faut leur assigner les signaux apparaissant aux champs les plus faibles;

ou bien l'influence sur l'azote d'une liaison covalente avec P est la même que celle d'une charge positive et les protons du carbone en α sortiront au même endroit dans les deux cas, alors que la structure électronique de l'oxygène serait plus profondément affectée par la présence sur l'azote d'une charge positive (on pourrait peut-être lui attribuer une charge positive partielle) On illustrerait ainsi la profonde influence réciproque des deux hétéroatomes dans ce cycle.

La préparation de dérivés analogues de l'α-méthyl-morpholine permettra sans doute de distinguer les deux groupes de protons et de résoudre cette question.

Le spectre R.M.N. permet de distinguer les groupes morpholyles des groupes morpholinium et de les dénombrer, même s'ils sont présents simultanément dans la même molécule (Tableau VII, Fig. 4 et 5).

Le spectre du chloro-morpholino-phosphate de déhydro-épiandrostérone (XVIII) montre un déplacement des signaux vers les fréquences plus faibles. Le déblindage des protons des méthoxyles par la présence d'un atome de chlore sur le phosphore a

été étudié (60). Il faut noter que cet effet est sensible sur la position des deux massifs.

Le groupe phényle dans l'oestrone-phosphomorpholidate de morpholinium (XXXVII) provoque un déplacement en sens inverse.

CHAPITRE III

METHYL-PHOSPHONATES DE STEROÏDES ET DE TERPENES

La préparation de méthyl-phosphonates de stéroïdes et de terpènes et des esters méthyliques correspondants a fait l'objet d'un travail indépendant (61).

L'un des buts de cette thèse est l'adaptation des méthodes physiques récentes à l'étude des dérivés phosphorés d'hormones stéroïdes et autres substances complexes. C'est dans le cadre de cette recherche d'outils physiques applicables à ce domaine que nous discuterons ici les propriétés physiques des méthyl-phosphonates de stéroïdes et de terpènes.

Les stéroïdes choisis peuvent être classés dans trois groupes suivant la nature et la position de l'hydroxyle phosphorylé :

- 17β-hydroxy-stéroïdes (testostérone, 19 nor-testostérone, Δ_4-androstérol, Δ_4-oestrénol, benzoate-3 d'oestradiol);
- 3-hydroxy, Δ_5-stéroïdes (déhydroépiandrostérone, prégnénolone cholestérol)
- stéroïdes ayant un hydroxyle phénolique en -3 (oestrone, oestradol, phényl-propionate-17 d'oestradiol).

Nous avons aussi préparé le di-(méthyl-phosphonate) d'oestradiol.

La mise en évidence d'un dédoublement secondaire des signaux dus aux méthoxyles en R.M.N. pour les esters méthyliques de certains méthyl-phosphonates de stéroïdes (chapitre VII) et l'attribution de cet effet à un encombrement stérique, nous ont conduit à préparer les méthyl-phosphonates de quelques terpènes (α-amyrine, bornéol, isobornéol) et du 4,4 diméthyl-cholestérol. (Tableau VIII).

PROPRIETES PHYSIQUES DES METHYL-PHOSPHONATES DE STEROIDES

Les acides stéroïde-méthyl-phosphoniques sont forts; comme ils sont trop peu solubles dans l'eau pour y être dosés, nous avons systématiquement utilisé le méthylcellosolve et l'eau (80/20) comme solvant. Les pK^{*}_{MCS} indiqués dans les tableaux 8 et 9 sont définis comme p. 28 (43). La série d'acides portant le groupe méthyl-phosphonyle en -3 sur un cycle aromatique se distingue des autres séries par une plus forte acidité. Inversement le groupe méthyl-phosphonyle exerce sur le spectre ultra-violet du noyau benzénique qui le porte le même effet hypsochrome et hypochrome que le groupe phosphoryle dans les acides stéroïde-phosphoriques (p. 28).

En R.M.N. les protons du méthyle porté par le phosphore donnent un doublet (J = 17,5 cps) caractéristique (Fig. 6) (62). Ce doublet est légèrement déplacé vers les champs plus faibles lorsque le groupe méthyl-phosphonyle est placé sur un cycle aromatique. Ceci permet de distinguer les deux groupes méthyl-phosphonyle portés par la même molécule dans l'exemple du di-(méthyl-phosphonate) d'oetradiol où les signaux sont bien séparés (δ = 88 et 96 cps) comme aussi sur le spectre de son ester méthylique (Fig. 7).

Les protons en -17 sur les méthyl-phosphonates en -17 donnent vers 250 cps un quadruplet dû au couplage avec les protons voisins (en -16) et avec le phosphore (Fig. 6). Les protons en -3 sur les méthyl-phosphonates de 3β-hydroxy, Δ_5-stéroïdes sortent à la même fréquence mais ne sont pas résolus.

Les signaux des protons du groupe $P\text{-}CH_3$ et du proton couplé avec le phosphore sur le cycle, se retrouvent dans le spectre des esters méthyliques (Tableau XVII);les signaux des méthoxyles seront étudiés au chapitre VII.

Les spectres du méthyl-phosphonate de bornyle et de son

Fig. 6

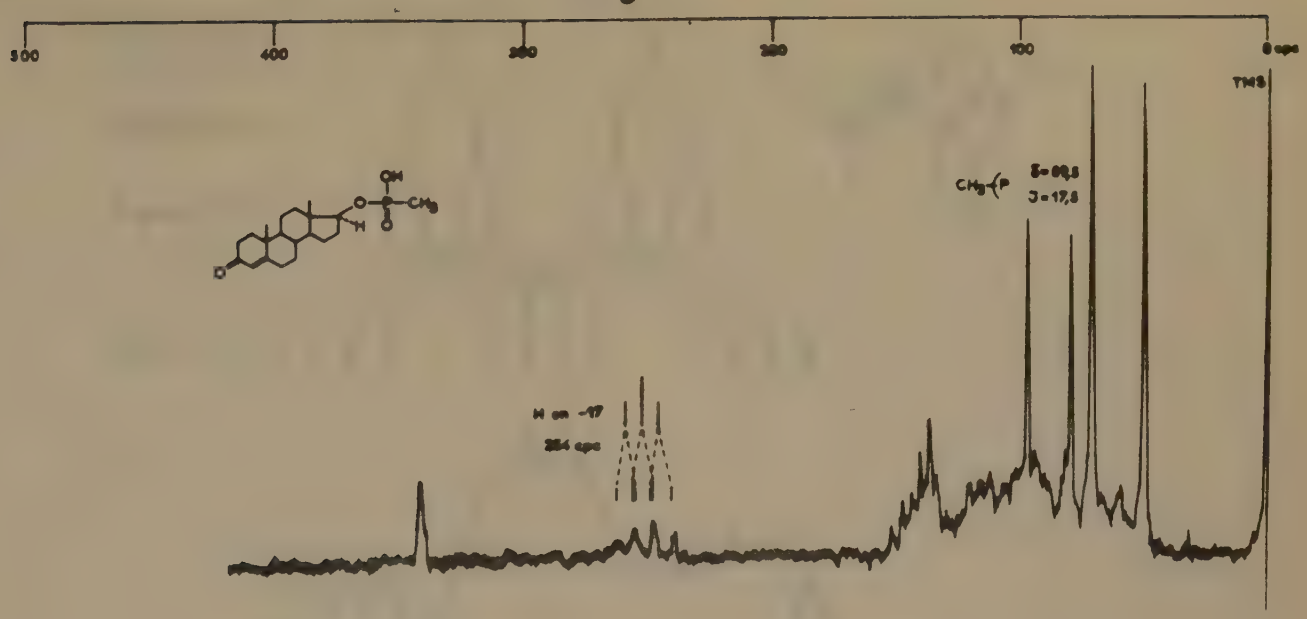

500
400
300
200
100
0 cps
TMS
δ=88,5
J=17,8
H en -17
284 cps

Fig. 7

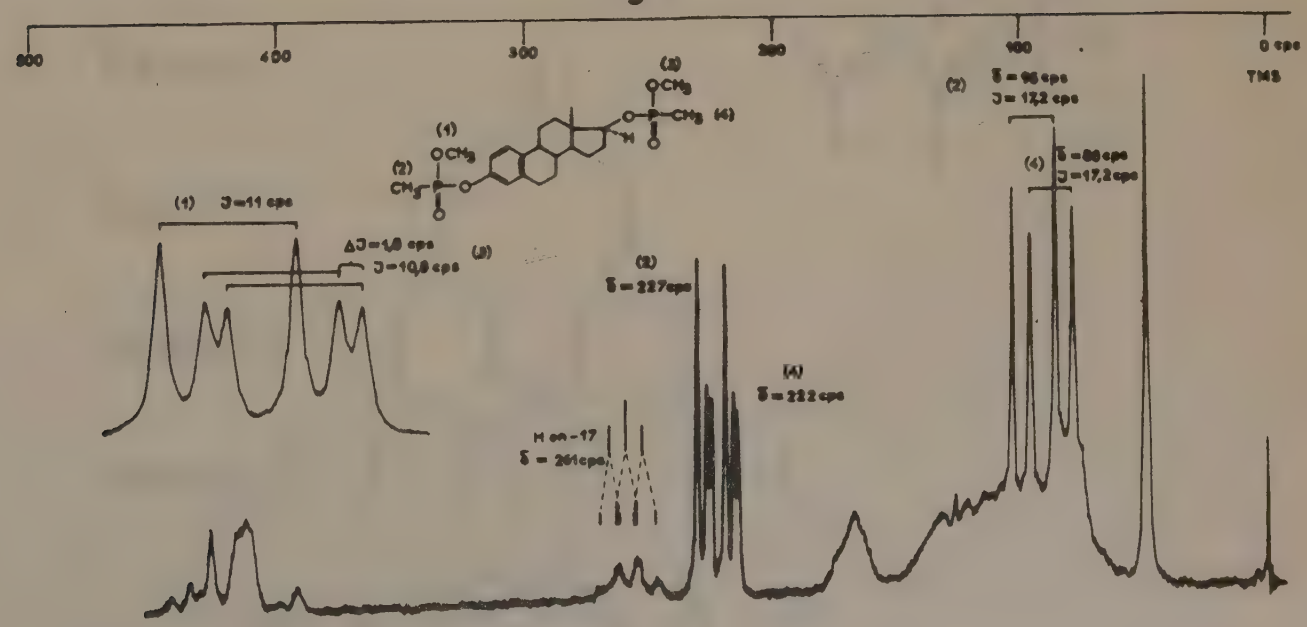

500
400
300
200
100
0 cps
TMS
(1) J=11 cps
ΔJ=1,8 cps
J=10,8 cps
(2)
δ=227cps
(4)
δ=222 cps
H en -17
δ = 261cps
(2) δ=96 cps
J=17,2 cps
(4) δ=88 cps
J=17,2 cps

Fig. 8

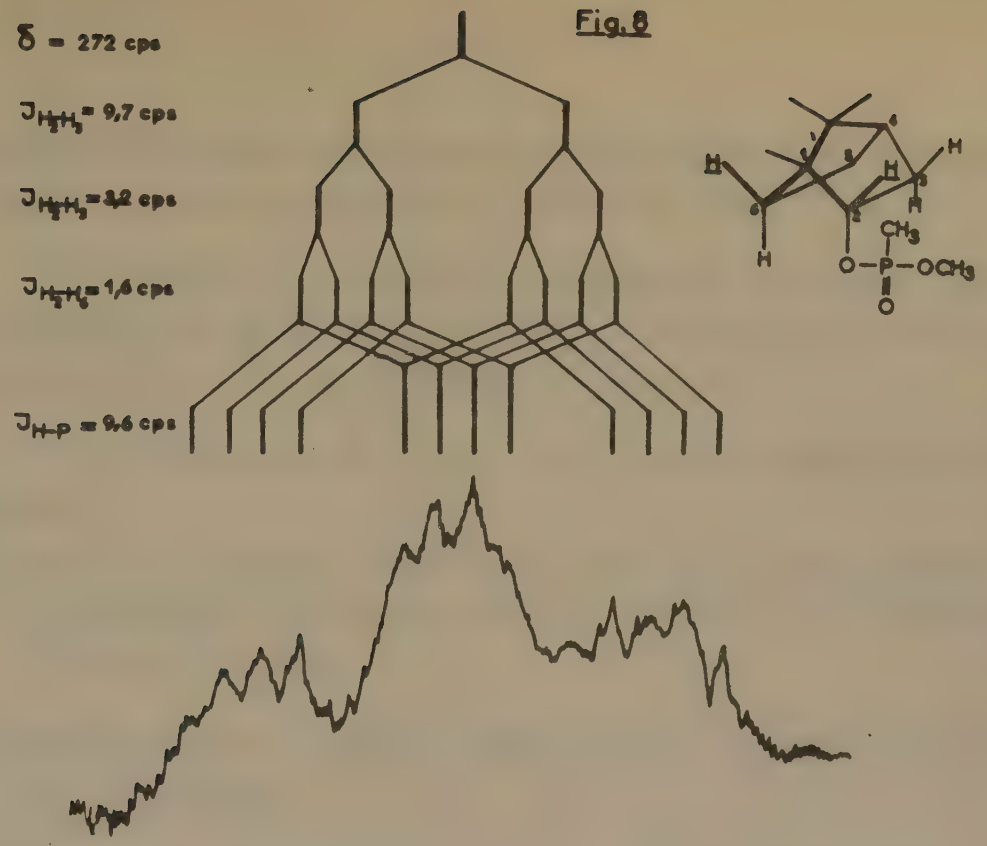
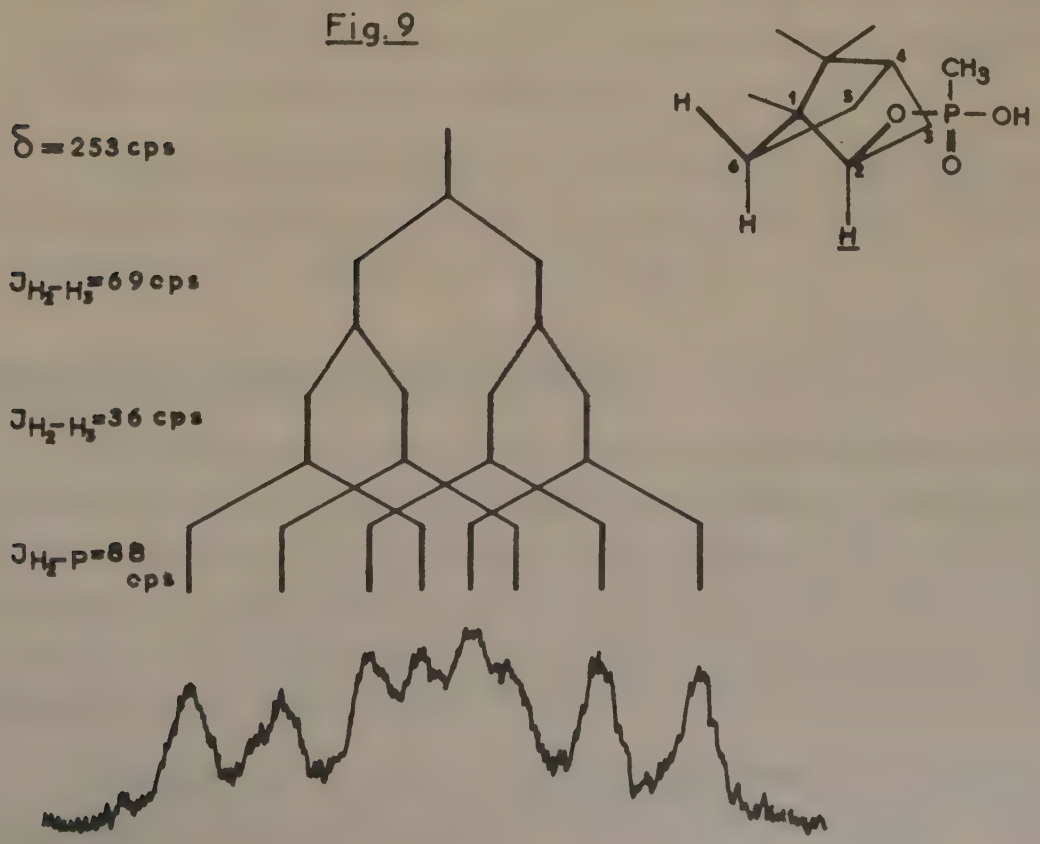

δ = 272 cps
J H2-H3 = 9,7 cps
J H2-H5 = 3,2 cps
J H2-H6 = 1,6 cps
J H-P = 9,6 cps
CH3
O-P-OCH3
O
H

Fig. 9


δ = 253 cps
J H2-H3 = 6,9 cps
J H2-H5 = 3,6 cps
J H2-P = 8,8 cps
CH3
O-P-OH
O
H

ester méthylique nous donnent deux exemples de couplages à longue distance à travers le cycle (63).

La molécule de méthyl-phosphonate de bornyle présente la conformation en W requise pour le couplage à travers le cycle du proton en 2 avec le proton en 6 (Fig. 8).

Le proton en 2 donne, à 272 cps un signal multiple résultant :

1) de son couplage avec les protons en α, ces protons ne sont pas équivalents et exercent sur le proton en -I des couplages de 9,75 et 3,2 cps.

2) du couplage à longue distance avec le proton en 6, on mesure J = 1,6 cps.

3) de son couplage avec P (J = 9,6 cps) qui donnerait au total 16 pics disposés en quatre quadruplets; mais la constante de couplage J_{H-P} est égale à l'une des constantes de couplage J_{H-H} avec les protons en α ce qui entraîne la superposition exacte des quadruplets médians.

Le méthyl-phosphonate d'iso-bornyle ne présente pas la conformation nécessaire pour un couplage à longue distance, l'H en -1 donne 8 pics analysés sur la Fig. 9.

Analyse des spectres infra-rouges

De nombreuses études de spectres infra-rouges de produits phosphorés ont permis d'attribuer les bandes d'absorption aux différents modes de vibration de la molécule (37, 50). Ces assignations ont été faites grâce à des molécules simples. Nous décrivons ici leur application à l'étude d'un groupe de molécules beaucoup plus complexes et de masse moléculaire plus élevée.

L'examen d'un seul méthyl-phosphonate de stéroïde ne permet d'ailleurs qu'une assignation incertaine des bandes d'absorption

mais les spectres de tous les méthyl-phosphonates discutés ici offrent une physionomie commune: une série de bandes à des positions remarquablement constantes se reconnaissent parmi les bandes d'absorption propres aux stéroïdes et peuvent être attribuées au groupe méthyl-phosphonyle. De plus les différents types de stéroïdes phosphorylés se distinguent entre eux par la position de certaines de ces bandes. Nous donnons ici une interprétation des spectres de ces produits, basée sur les données de la littérature (37, 50, 65), en tenant compte des caractères particuliers de chaque groupe pour interpréter les déplacements de certaines bandes d'absorption.

Le choix du solvant appelle une remarque: le chloroforme, qui est un bon solvant des acides stéroyl-méthyl-phosphoniques, permet d'obtenir des spectres bien résolus mais possède une bande d'absorption à 1218 cm^{-1} dans la région ou absorbe le groupe phosphoryle; cette bande a une intensité suffisante, sous 0,1 mm, pour dédoubler la bande de vibration du phosphoryle. Par ailleurs le chloroforme ne permet pas non plus d'étudier les vibrations de P-O (vibration de valence symétrique) vers 780 cm^{-1} et P-C vers 760 cm^{-1}. Les spectres mesurés sur une pastille dans du KBr permettent de repérer ces deux bandes mais sont peu lisibles dans les autres régions où la position des bandes, souvent multiples, varie dans une large mesure d'un stéroïde à l'autre.

La solubilité du méthyl-phosphonate de cholestéryle dans le tétrachlorure de carbone et dans le benzène nous a permis de constater que la position des bandes, et en particulier de celle du phosphoryle, était constante d'un solvant à l'autre. Finalement nous avons pu prendre quelques spectres dans le tétrachlorure de carbone, les autres ont été mesurés dans le chloroforme; il ne faut alors pas perdre de vue la raison du dédoublement de la bande d'absorption de P=O.

Identification du groupe P)-OH

Une bande large, vers 2350 cm^{-1}, absente dans les méthyl-phosphonates diestérifiés, peut être attribuée à la vibration de valence de P)-O-H (64). La fréquence de vibration observée pour cette liaison est généralement plus élevée dans les spectres de dialcoyl-phosphates (2560-2700). On peut expliquer le déplacement de cette bande vers les basses fréquences dans les méthyl-phosphonates par l'effet inductif donneur du méthyle directement lié au phosphore qui favorise la formation de la liaison hydrogène entre l'hydroxyle et le phosphoryle.

Une autre bande large et peu intense, qui disparaît également lorsque l'on traite l'acide par du diazométhane, est attribuée à une vibration de déformation de la même liaison.

Vibrations du groupe CH_3-(P

La vibration de déformation symétrique de ce groupe donne naissance à une bande intense et étroite, très caractéristique, dont la position est remarquablement constante à 1316 - 1312 cm^{-1} au lieu de 1380 cm^{-1} qui est la fréquence généralement observée pour cette vibration du groupe CH_3.

La vibration de balancement (rocking) de ce méthyle peut probablement être attribuée à une bande également intense entre 917 et 906 cm^{-1} (65).

Vibration de la liaison semi-polaire

Les spectres mesurés dans le tétrachlorure de carbone montrent que la fréquence de vibration de la liaison P=O se situe de 1195 à 1200 cm^{-1} pour les méthyl-phosphonates de 17β-hydroxy-stéroïdes et de 3β-hydroxy Δ_5-stéroïdes. L'étude de cette bande est difficile dans les spectres mesurés dans le chloroforme, on peut cependant en conclure que la position de cette bande est

constante pour les méthyl-phosphonates de ces deux types de stéroïdes et qu'elle est déplacée vers les plus hautes fréquences lorsque la fonction est portée par un cycle aromatique. La fréquence de vibration de P=O est en effet sensible à l'électronégativité de ses substituants comme nous l'avons vu p. 37.

La fréquence de vibration de P=O est déplacée de 40 à 50 cm^{-1} vers les hautes fréquences lorsque l'on passe de l'acide stéroïde-méthyl-phosphonique au composé entièrement estérifié (spectres dans CCl_4). La différence d'électronégativité entre hydroxyle et alcoyle est loin d'être suffisante pour expliquer ce déplacement. Il faut rapprocher cet effet du déplacement de 1230 à 1272 cm^{-1} observé pour cette bande entre les acides stéroïde-phosphoriques et les esters correspondants (p.16 et 38) et l'expliquer comme DAASCH et SMITH par la formation d'une liaison hydrogène intramoléculaire (57).

Vibration de déformation de la bande P)-O-C

Nous attribuons à cette vibration une bande très intense, sensible à la nature du stéroïde phosphorylé, que nous trouvons à des valeurs très constantes; 1050 cm^{-1} lorsque le groupe méthyl-phosphonyle est porté par le cycle D à cinq chaînons et 1035 cm^{-1} pour les méthyl-phosphonates de 3β-hydroxy Δ_5-stéroïdes; la bande est absente lorsque le cycle phosphorylé est aromatique.

Cette fréquence de vibration est donc la même que celle que l'on observe dans les phosphates (1050 - 1030 cm^{-1}) (57). BELLAMY et BEECHER (38) attribuent au groupe P-O-C (aryle) une bande intense vers 1200 cm^{-1} qu'il ne sera donc pas possible de distinguer de la bande d'absorption du P=O dans les méthyl-phosphonates surtout si les spectres sont pris en solution dans le chloroforme.

Une autre bande, très constante à 1023 cm^{-1} dans les spectres des méthyl-phosphonates de 17 -hydroxy-stéroïdes, dont la

position exacte ne peut pas être déterminée pour les méthyl-phosphonates de 3β-hydroxy, Δ_5-stéroïdes et absente dans les méthyl-phosphonates fixés au cycle aromatique, est peut-être attribuable à la même vibration.

Vibration de la liaison P-O-(C

La vibration de valence asymétrique de cette bande a été située au voisinage de 980 cm^{-1} par plusieurs auteurs (38, 66). Nous trouvons à 998 cm^{-1} une très forte bande dont la position ne dépend pas de la nature du stéroïde phosphorylé.

La vibration symétrique de cette liaison donne une bande beaucoup moins intense dans la région de 764 à 788 cm^{-1} (64-65).

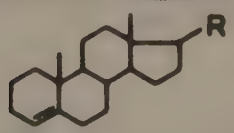
Vibration de la liaison P-C

QUINCHON et collaborateurs ont reconnu que la vibration de valence de cette liaison donnait naissance à une bande assez variable en position et en intensité dans la région de 785 à 720 cm^{-1}. Nous retrouvons pour cette vibration une bande de faible intensité, entre 770 et 754 cm^{-1}, dans les spectres des méthyl-phosphonates de stéroïdes (64-65).

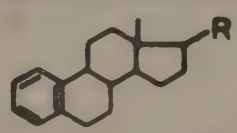
Cette étude confirme le caractère particulier du méthyle directement lié au phosphore et son influence sur la structure électronique de la molécule, elle montre surtout que le groupe méthyl-phosphonyle peut être identifié très sûrement par spectrographie infra-rouge, même s'il est substitué par des radicaux lourds.

TABLEAU VIII.

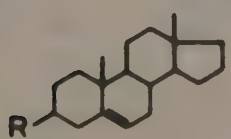
METHYL-PHOSPHONATES	Rdt %	F °C	U. V. (CH_3OH) λ_{max} (mμ) ε_{max}	pK_{MCS}	R M N P—CH_3 δ	R M N P—CH_3 J	R M N H en -3 δ	Analyses C	Analyses H	Analyses P
(XXXVIII) $C_{20}H_{31}O_4P$ = 366,42	90	184-185	241 (18700)	4,60	89	17,5	254	Calc: 65,55 Tr: 65,48	8,52 8,28	8,45 8,59
(XXXIX) $C_{19}H_{28}O_4P$ = 351,39	81	155	240 (16350)		88	17,5	253	Calc: Tr:		8,81 8,68
(XL) $C_{20}H_{33}O_3P$ = 348,37	78	148-150	——		87	17,5	249	Calc: 68,15 Tr: 68,14	9,44 9,20	8,79 8,83
(XLI) $C_{19}H_{30}O_3P$ = 337,41	60	138-140	——		86	17,5	251	Calc: 67,61 Tr: 67,40	8,96 8,92	9,19 9,18
(XLII) $C_{19}H_{27}O_4P$ = 350,38	—	240-243	280,5 (1930)	4,48				Calc: 65,12 Tr: 64,98	7,76 7,50	8,83 8,78
(XLIII) $C_{26}H_{31}O_5P$ = 454,48	91	212-217	230,5 (14100)	4,45	91	17,5	253	Calc: 68,70 Tr:	6,87 6,80	6,82 6,86
(XLIV) $C_{20}H_{29}O_4P$ = 364,40	80	196-197	278,5 (1245) 287,5 (1215)		90,5	17,5	258	Calc: 65,91 Tr: 66,04	8,02 8,00	8,50 8,67
(XLV) $C_{22}H_{35}O_4P$ = 394,47	65	150-156	284 (66)	4,30	88,5	17,5	252	Calc: 66,98 Tr: 66,98	8,94 8,66	7,86 7,86
(XLVI) $C_{20}H_{31}O_4P$ = 366,42	60	221-222	293 (43)	4,28	88,5	17,5	252	Calc: 65,54 Tr: 65,45	8,52 8,26	8,45 8,46
(XLVII) $C_{28}H_{49}O_3P$ = 464,65	70	138-140			88,5	17,5	252	Calc: 72,39 Tr: 72,36	10,42 10,53	6,65 7,01



XXXVIII: 3-oxo;
XXXIX: 3-oxo, 19nor;
XL: ——
XLI: 19nor;



XLII: 3-hydroxy;
XLIII: 3-benzoate;
XLIV: 3-méthoxy;



LXV: I7-oxo;
LXVI: I7β-méthyl-oxtane;

LXVII: I7β-

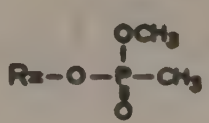
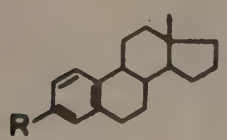


TABLEAU VIII (suite).

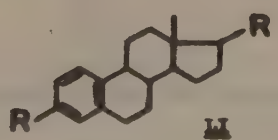
METHYL-PHOSPHONATES	Rdt %	F °C	U. V. (CH_3OH) λ_{max} (mμ) ε_{max}	pK_{MCS}	R. M. N. P—CH_3 δ J	H(cycle) δ	Analyses C	H	P
(XLVIII) $C_{19}H_{25}O_4P$ = 348,37	87	207-208	270 II20 276 I060	3,42	93 17,5.	—— .	Calc: 65,49 Tr: 65,49	7,23 6,91	8,89 8,77
(XLIX) $C_{19}H_{27}O_4P$ = 350,38		203-204	270 (1070) 276,5 (1000)	3,45			Calc: 65,12 Tr: 65,15	7,76 7,71	8,83 9,03
(L) $C_{28}H_{35}O_5P$ = 482,53	88	176-178	268 (1140) 276,5 (990)	3,47	88,5 17,5	——	Calc: 69,50 Tr: 69,67	7,31 7,08	6,43 6,48
(LI) $C_{20}H_{30}O_6P_2$ = 428,39	98	188-189	270 (1150) 276,5 (980)		88,5 17,5 250 100 17,5 ——		Calc: 56,06 Tr: 56,02	7,09 6,37	14,47 14,42
(LII) $C_{30}H_{53}O_3P$ = 492,70	45	194-196			88 17,5 238		Calc: Tr:		6,29 6,60
(LIII) $C_{31}H_{53}O_3P$ = 504,71	32	231-233			88 17,5 240		Calc: 73,77 Tr: 73,77	10,58 10,43	6,14 6,18
(LIV) $C_{11}H_{21}O_3P$ = 232,25	55	129-131			88 17,5 272		Calc: 56,88 Tr: 56,97	9,11 9,10	13,34 13,39
(LV) $C_{11}H_{21}O_3P$ = 232,25	52	129-130			88 17,5 253		Calc: 56,88 Tr: 57,23	9,11 9,15	13,34 13,34



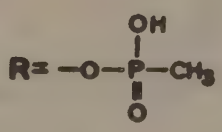
XLVIII: I7-one

XLIX: I7-hydroxy

L: I7-phenyl-propionate

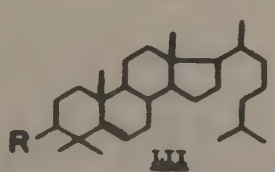


LI

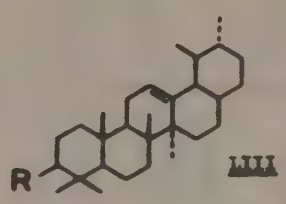


LIV

LV



LII



LIII

TABLEAU IX

SPECTRES INFRA-ROUGES DANS $CHCl_3$ DE METHYL-PHOSPHONATES DE STEROÏDES

Méthyl-phosphonates	P) - OH		P) - CH_3		P = O			P) O - C		P - O (C		P - C
	Valence	déform.	sym.	rocking	(CCl_4)	($CHCl_3$)		déform.	?	asym.	sym. (KBr)	(KBr)
17 -hydroxy -stéroïdes (5 composés examinés; 2 ds.CCl_4)	2330 | 2340	1670 | 1690	1314 | 1316	906 | 917	1200	1230 | 1232	1190 | 1195	1050 | 1052	1020 | 1025	994 | 998	765 | 788	754 | 763
3-hydroxy -stéroïdes (3 composés examinés; 2 ds.CCl_4)	2290 | 2340	1670	1314 | 1316	912 | 915	1197	1230 | 1234	1187 | 1193	1030 | 1036	massif	988 | 998	763 | 780	743 | 758
3-hydroxy -stéroïdes Cycle A aromatique (2 composés examinés)	2300 | 2380		1316 | 1314	907		1230 | 1232	1198 | 1205	—	—	997 | 998	785	760 | 770
terpènes (4 composés examinés)	2320 | 2340	1675 | 1680	1314 | 1318	910 | 915		1232 | 1235	1186 | 1187	1030 | 1053	1000 | 1024	massif	774	745

CHAPITRE IV

PREMIERE PREPARATION ET CARACTERISATION DU PYROPHOSPHATE P_1-OESTRONE, P_2-ADENOSINE

Nous avons exposé dans l'introduction les raisons qui nous ont poussé à préparer des stéroyl-nucléotides. Il s'agissait donc de condenser deux monoesters phosphoriques en un pyrophosphate disubstitué dissymétrique.

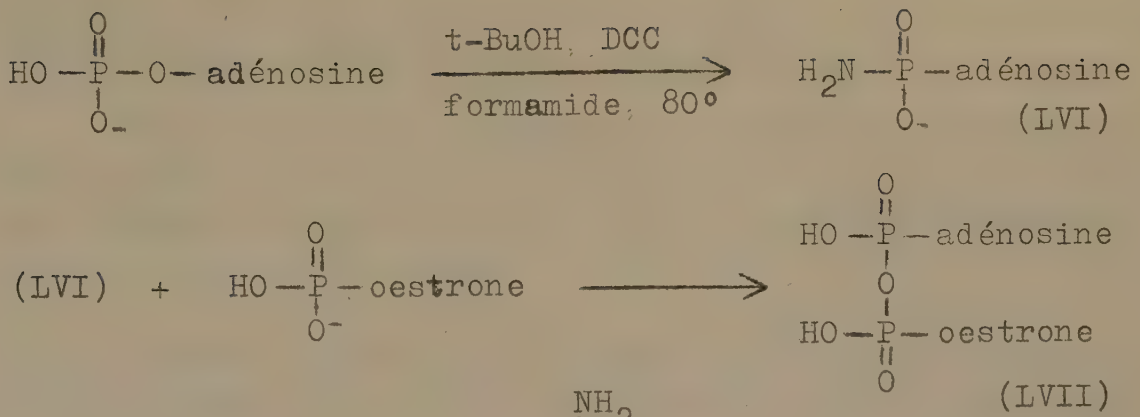
Nous avons étudié d'abord la condensation de l'acide oestrone-phosphorique et de l'acide adénylique (AMP) en pyrophosphate P_1-oestrone, P_2-adénosine en vue de mettre au point une méthode générale.

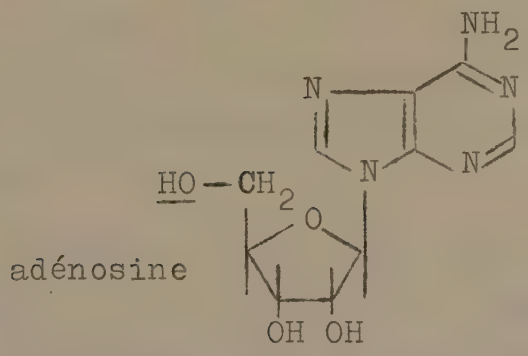
Ce chapitre et le chapitre suivant décrivent d'une part le choix et la mise au point d'une méthode de condensation, d'autre part la mise en évidence, l'isolement et la caractérisation complète du stéroyl-nucléotide parmi les produits de la réaction.

Les résultats obtenus ont permis la préparation d'autres stéroyl-nucléotides (Chapitre VI).

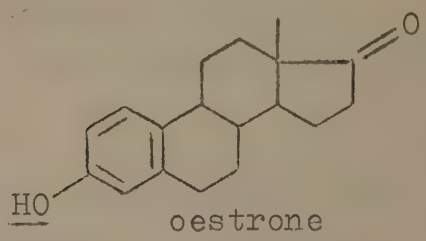
Au moment où nous entreprenions ce travail, MOFFAT et KHORANA publiaient la synthèse de l'uridine-diphosphate-glucose (UDPG) et du flavine-adénine-dinucléotide (FAD) par attaque nucléophile d'un phosphoramidate par un ester phosphorique (67). La préparation du phosphoramidate d'adénosine était décrite simultanément par CHAMBERS et MOFFAT (53).

La première méthode de condensation que nous ayons essayée fut donc l'action de l'acide oestrone-phosphorique sur le phosphoramidate d'adénosine suivant :





adénosine



oestrone

Cette réaction sera analysée en détail dans le prochain chapitre.

L'emploi de la méthode est rendu difficile par l'insolubilité du phosphoramidate d'adénosine dans la pyridine. Une série d'essais préliminaires nous a fait rejeter la quasi-totalité des bons solvants du phosphoramidate, tels la formamide, le diméthylsulfoxide et l'o-chlorophénol qui semblent inhiber la réaction et favorisent la formation de produits secondaires. Nous avons finalement retenu pour milieu réactionnel la diméthylformamide additionnée d'un peu de pyridine. Le phosphoramidate n'est que peu soluble dans ce mélange et nous avons mené la réaction en phase hétérogène. On réalise une suspension très fine en agitant vigoureusement le mélange réactionnel avec des billes de verre.

L'analyse de cette suspension à intervalles réguliers par chromatographie sur papier prouve qu'une réaction a lieu dans ces conditions.

Nous avons cherché simultanément à mettre en évidence l'acide P_1-oestrone, P_2-adénosine pyrophosphorique attendu sur les

premiers essais de condensation. La méthode de choix dans ce domaine est la chromatographie sur papier.

Tous les produits contenant de l'adénine absorbent à 260 mμ et inhibent la fluorescence du papier, et sont ainsi repérés sur les chromatogrammes développés, grâce à une lampe à vapeur de mercure du type Mineralight.

L'acide oestrone-phosphorique, lui, n'absorbe que très peu à cette longueur d'onde (ε = 675 à 260 mμ contre 15200 pour l'AMP, soit environ 4 %), mais donne une forte coloration rouge-violacé au test de Zimmermann (solution méthanolique alcaline de 2,4-dinitrobenzène).

La tache qui, sur les chromatogrammes, correspond au pyrophosphate dissymétrique P_1-oestrone, P_2adénosine sera donc repérée simultanément par les deux procédés de détection.

Le solvant II, isopropanol/ammoniaque/eau (7/I/2) d'abord utilisé, résout le mélange brut en 4 taches principales repérées à la lumière ultra-violette; l'une d'elles contient de l'oestrone, nous l'appellerons (X). Quelques mg du produit correspondant à la tache (X) ont pu être isolés par chromatographie préparative sur papier et nous ont permis d'effectuer des mesures de dispersion rotatoire et du coefficient d'extinction moléculaire à 260 mμ. Le rapport oestrone/adénosine déduit de ces mesures est environ de 3. L'absence sur le chromatogramme de tache correspondant à l'acide oestrone-phosphorique n'ayant pas réagi, ainsi que le voisinage de Rf de l'acide oestrone-phosphorique et de la tache (X) nous ont incité par ailleurs, à rechromatographier cette dernière. La tache (X) est effectivement dédoublée en deux taches distinctes par des solvants acides tels que :

éther isopropylique/acide formique (5/3)

ou n-butanol/acide formique/eau (75/10/15)

l'une de ces deux taches est l'acide oestrone-phosphorique,

l'autre (Y) n'a pu être dédoublée par une nouvelle chromatographie ou par électrophorèse.

Ainsi tous les constituants du mélange peuvent être séparés en chomatographie bidimensionnelle ascendate par un système de deux solvants, l'un basique, l'autre acide. Les spectres ultra-violets des spots élués ont été tracés, celui de la tache (Y) présente, par rapport au spectre de l'AMP un déplacement du minimum vers les courtes longueurs d'onde (min. à 234 mμ au lieu de 230 mμ); ce déplacement correspond à l'influence de l'acide oestrone-phosphorique sur le spectre U.V. dans l'association d'une molécule d'AMP avec une molécule de cet acide.

La formation d'un composé d'addition, vraisemblablement le pyrophosphate dissymétrique attendu était donc mise en évidence. Il devenait nécessaire d'isoler une quantité suffisante de ce produit pour permettre sa caractérisation complète. La séparation préparative a été tentée par électrophorèse en continu à l'aide d'un appareil Shandon sous 250 V dans un tampon au citrate de sodium (pH 3,5) (68). Ce procédé ne nous a pas donné satisfaction. La chromatographie sur échangeurs d'ions, par contre, nous a permis d'isoler tous les constituants du mélange en pics distincts (Fig. 10).

Pour cela nous utilisons une résine anionique Dowex 2X8 éluée par un gradient d'acide formique allant jusqu'à 8N. Les éluats sont refroidis, lyophilisés, puis identifiés par chromatographie sur papier. Tous les produits élués sont stables et donnent des taches uniques dans ces conditions, sauf le phosphoramidate d'adénosine, premier pic élué, qui s'hydrolyse pour donner de l'acide adénylique et, consécutivement, le pyrophosphate symétrique di-adénosine.

La partie stéroïdique est très fortement retenue sur la résine, même si le degré de réticulation de cette dernière est

plus faible. Ainsi le pyrophosphate dissymétrique P_1-oestrone, P_2-adénosine n'est élué que par l'acide formique 8N. L'acide oestrone-phosphorique n'apparaît qu'à la régénération de la colonne.

L'addition de quelques gouttes d'eau au résidu de lyophilisation contenant le pyrophosphate dissymétrique le fait cristalliser en fines aiguilles. Nous en avons isolé ainsi une première fois 11 mg ce qui a permis les déterminations spectrophotométriques: le spectre de dispersion rotatoire moléculaire correspond au spectre calculé: l'allure et la position du maximum et du minimum dans le spectre ultra-violet correspondent à ceux que nous attendions mais le coefficient d'extinction moléculaire à 260 mμ est un peu plus faible (voir page 54); le dosage du phosphore est satisfaisant.

La séparation chromatographique sur échangeurs d'ions est propre et efficace pour une quantité de mélange brut ne contenant pas plus de 0,1 mM d'AMP et autant d'oestrone au départ; cette méthode fournit en outre, si l'on mesure la densité optique des éluats, des données quantitatives permettant d'estimer la proportion des corps présents après réaction. Mais cette méthode se heurte à de sérieuses difficultés lorsqu'on tente de la transposer à une échelle supérieure. Ces difficultés sont essentiellement dues à la faible solubilité du pyrophosphate P_1-oestrone, P_2-adénosine dans l'acide formique 8N. La solution éluante est rapidement saturée en produit; de ce fait l'élution traîne, la chromatographie devient longue, la diffusion des produits sur la colonne augmente, par conséquent la séparation devient moins bonne et l'hydrolyse des corps commence à être sensible. De plus nous n'étions pas équipés pour la lyophilisation rapide de gros volumes d'éluats.

Un essai de séparation par adsorption sur du charbon actif suivi d'élution par des solutions ammoniacales n'a pas été satisfaisant.

Le but que nous nous étions fixé étant la préparation de stéroyl-nucléotides en quantités de l'ordre du gramme, il devenait nécessaire de trouver un autre procédé de séparation. Nous pouvions aussi espérer éviter complètement les méthodes chromatographiques à condition d'atteindre un rendement suffisant pour pouvoir précipiter l'acide directement.

Caractérisation de l'acide P_1-oestrone, P_2-adénosine pyrophosphorique

Le pyrophosphate présente un effet Cotton positif à 205 mμ dans l'eau, avec une rotation spécifique de 1200°. La courbe de dispersion rotatoire correspond à la somme des courbes de l'acide oestrone-phosphorique et de l'acide adénylique dans l'eau (Fig.11). La courbe de dichroïsme circulaire, mesurée dans une solution tampon à pH 7, est celle de l'acide oestrone-phosphorique, l'acide adénylique ne présente pas de dichroïsme propre.

Le spectre ultra-violet répond à la courbe calculée en additionnant celles de l'oestrone et de l'AMP, mais avec un abaissement de 23 % du coefficient d'extinction moléculaire à 260 mμ (ϵ = 12600 au lieu de 16000) (Fig. 12).

Il faut rapprocher cet effet de l'hyperchromie, encore inexpliquée, que l'on observe lors de la dégradation chimique ou enzymatique d'acides ribonucléiques et aussi de molécules plus petites: polynucléotides synthétiques, oligodeoxynucléotides, phosphates dinucléosides et pyrophosphate symétrique d'adénosine (18, 69).

Le spectre infra-rouge présente la forte bande d'absorption à 1240 cm^{-1} des liaisons P=O. On reconnaît à 1740 cm^{-1} le carbonyle en-17 de l'oestrone.

Le dosage électrométrique montre l'existence de deux acidités très forte, neutralisées simultanément, et confirme la masse moléculaire.

Fig. 10

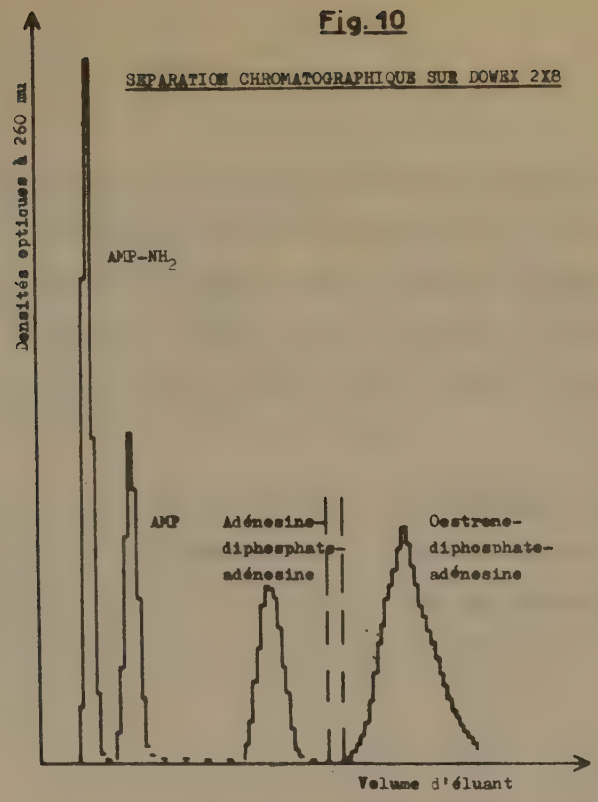


Fig. 11

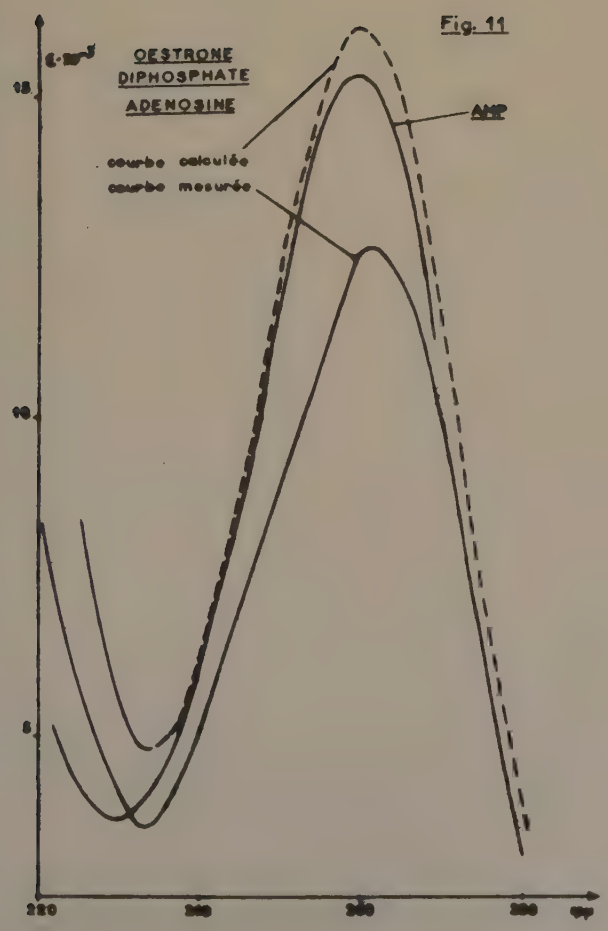
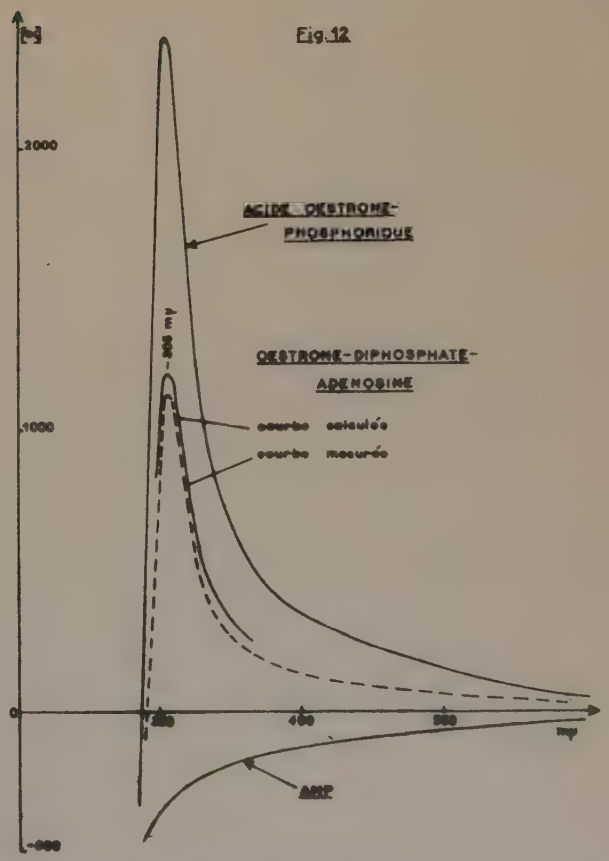


Fig. 12



L'hydrolyse par l'acide chlorhydrique N n'est complète qu'après 6 h à la température ordinaire. Il n'y a pas d'hydrolyse décelable par chromatographie sur papier dans l'acide formique 8N après 48 h dans les mêmes conditions. L'hydrolyse enzymatique par le venin de Crotalus adamanteus donne l'acide oestrone-phosphorique et l'acide adénylique.

Le spectre de R.M.N. du pyrophosphate après traitement par une solution de diazométhane dans l'éther, montre à 232 cps le signal dédoublé (J = 11,5 cps) des groupes méthoxyles portés par le phosphore. On dénombre 1,94 méthyles.

CHAPITRE V

COMPARAISON DE METHODES DE CONDENSATION D'ESTERS PHOSPHORIQUES

La sélection d'une méthode permettant d'obtenir des esters pyrophosphoriques mixtes avec de bons rendements et en quantité quelconque était nécessaire.

Les méthodes de condensations décrites dans la littérature peuvent être classées sous quatre rubriques :

D'abord la méthode classique utilisant l'action d'un chlorure de phosphoryle sur un ester phosphorique: Cette méthode a permis à TODD et al. de mener à bien les premières synthèses de coenzymes (70, 71). Mais l'accès aux chlorures de phosphoryles estérifiés reste difficile et les rendements globaux sont faibles.

Un second groupe de méthodes fait appel à un agent déshydratant, nous les appellerons méthodes directes. La plus représentative utilise la dicyclohexylcarbodiimide (DCC). Nous avons fait figurer dans notre étude le DCC, le trichloracétonitrile, la diméthylcyanamide et l'isocyanate de n-butyle comme étant les plus employés. Plusieurs autres réactifs similaires ont été proposés parmi lesquels on peut citer la cyanamide (72), les chlorures d'imidoyles (73,74) et les sulfonates d'oximes (75).

Un troisième groupe de méthodes vise la préparation d'intermédiaires réactifs analogues à ceux, plus difficilement isolables, impliqués dans les condensations du groupe précédent. Notre choix s'est fixé sur les phosphoramidates et phosphomorpholidates utilisés avec succès par KHORANA; CRAMER propose encore la préparation des phosphates de carbamyle (76) d'imidoyle (73) et des phosphorimidazolidates (77).

Enfin, plus récemment, on a décrit des procédés basés sur

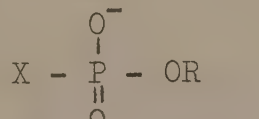
le déplacement de l'un des anions phosphoriques d'un pyrophosphate trisubstitué convenablement choisi.

CRAMER échange ainsi l'anion diéthyl-phosphorique (78) et MICHELSON l'anion diphényl-phosphorique. Nous avons utilisé cette dernière voie avec succès.

La méthode classique peut être rattachée aux précédentes, d'un point de vue formel, en considérant le chlorure comme l'anion déplacé. De même les condensations utilisant des acides forts comme agents déshydratants, l'anhydride trifluoracétique (79, 80) ou le chlorure de p-nitrobenzènesulfonyle (79) font intervenir la substitution d'un anion dans un anhydride intermédiaire.

Remarquons que, dans cette classification, la même méthode est citée sous deux rubriques différentes suivant que l'on cherche, en l'appliquant, à isoler ou non l'intermédiaire réactif.

En fait toutes les méthodes de condensation impliquent le passage par un composé d'addition du type :



(LXXII)

où X est un élément électronégatif ou un groupe rendant le phosphore électrophile et facilitant l'attaque nucléophile ultérieure de cet atome.

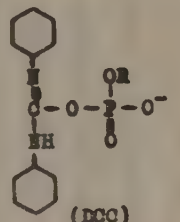
De ce point de vue nous pouvons répartir les méthodes de condensation plus rationnellement en trois catégories suivant que l'intermédiaire en question est :

- un phosphate d'imidoyle ou d'énol (méthode au DCC, trichloracétonitrile, diméthylcyanamide, isocyanate de n-butyl, etc...)
- un phosphoramidate (XH sera alors une amine).
- un anhydride mixte (où XH est un acide fort).

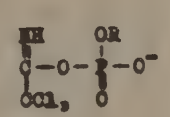
TABLEAU X.

COMPOSES INTERMEDIAIRES REACTIFS INTERVENANT DANS LES REACTIONS DE CONDENSATION.

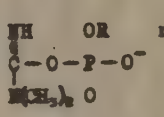
I. Phosphates d'imidoyle et phosphates d'énols.



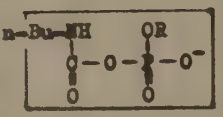
(DCC)



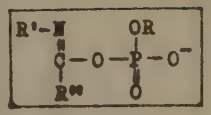
(CCl_3-CN)



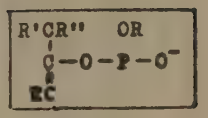
$(CH_3)_2N$-CN



n-Bu-N=C=O

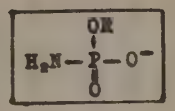


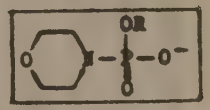
phosphates d'imidoyles



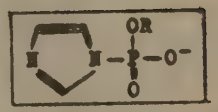
phosphates d'énols

II. Phosphoramidates.



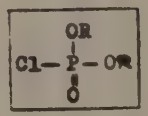


phospho-morpholidates

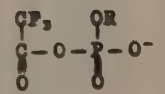


phospho-imidazolidates

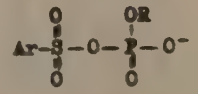
III. Anhydrides d'acides forts.



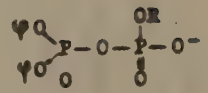
(phospho-chloridate)



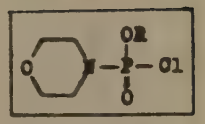
(anhydride trifluoro-acétique)



(sulfochlorure)



(chlorure de diphényle-phosphoryle)



(chloro-morpholino-phosphate)

Les intermédiaires isolables sont encadrés.

Les principaux intermédiaires décrits sont classés ainsi dans le tableau XI .

On a fait l'hypothèse que l'agent phosphorylant serait dans tous les cas un métaphosphate, monomère (81) ou trimère (82) formé à partir de l'intermédiaire (LXXII) en présence d'une base. Cette hypothèse s'applique aussi à la phosphorylation oxydative (83).

La méthode idéale, pour la préparation de pyrophosphates dissymétriques, fera intervenir un intermédiaire à la fois très réactif et suffisamment stable pour que l'on puisse séparer les deux stades de la condensation dans des conditions expérimentales précises.

Nous avons adapté toutes les méthodes choisies à la préparation de l'acide (P_1-oestrone, P_2-adénosine) pyrophosphorique. De nombreux essais préliminaires ont chaque fois été nécessaires pour préciser les conditions opératoires optimales. Nous avons cherché surtout à diminuer le nombre et la proportion de produits secondaires pour faciliter la séparation des mélanges dans les expériences préparatives. Pour chaque méthode nous avons recherché un solvant ou un mélange de solvants, l'influence de l'humidité, de la température, de la présence d'amines tertiaires; la dilution du milieu réactionnel nous est aussi apparue comme un facteur important. Pour chaque facteur étudié, une série d'essais systématiques ont été effectués dans des conditions identiques, sur des quantités de substances de 1 à 2 mg chaque fois, et analysés comparativement par chromatographie sur papier (solvant I) Notons dès maintenant qu'au cours de ces essais, et pour toutes les méthodes étudiées, un seul produit de condensation dissymétrique a été décelé.

La comparaison entre elles des méthodes de condensation ainsi précisées a été basée sur l'analyse quantitative des mélanges bruts de réaction par chromatographie sur résine Dowex

2X8/formiate/avec gradient d'élution.

Tous les essais préparatifs ont porté sur des proportions stoechiométriques d'acide oestrone-phosphorique et d'acide adénylique. On a chromatographié des portions de mélange réactionnel brut contenant environ 0,05 mM de chaque acide au départ.

Les différents constituants sortent de la colonne en pics entièrement séparés. Le pyrophosphate P_1-oestrone, P_2-adénosine, fortement retenu, n'est élué qu'avec l'acide formique 8N dans lequel il reste cependant stable à froid. L'acide oestrone-phosphorique et le pyrophosphate symétrique di-oestrone sont trop solidement fixés sur la colonne pour être élués au cours de la chromatographie et n'apparaissent qu'à la régénération de la résine. La densité optique des éluats a été mesurée à 260 mμ, leur homogénéité vérifiée par chromatographie sur papier.

La proportion des différents corps en présence dans les mélanges réactionnels a été déduite de la densité optique des pics élués correspondants.

Les résultats obtenus n'expriment donc pas des rendements en produits isolés mais la répartition du nucléoside présent au départ entre les constituants du mélange après réaction.

Nous avons tenu compte dans le calcul de ces valeurs :

- de l'absorption propre de l'oestrone à 260 mu représentant 5 % de l'absorption du pyrophosphate dissymétrique.

- de l'hypochromie présentée par le pyrophosphate symétrique diadénosine par rapport à l'adénosine (13 % en milieu acide) (84).

- de l'hypochromie constatée pour le pyrophosphate P_1-oestrone, P_2-adénosine, estimée à 23 % (voir page 54).

Le tableau XIII résume les calculs. Les résultats comparatifs sont rassemblés dans le tableau (XIV). Ces tableaux figurent à la fin du chapitre.

I. CONDENSATION DE L'ACIDE OESTRONE-PHOSPHORIQUE AVEC L'ACIDE ADENYLIQUE EN PRESENCE D'UN AGENT DESHYDRATANT

A.- En présence de dicyclohexylcarbodiimide

La dicyclohexylcarbodiimide peut fixer une molécule d'eau pour donner la dicyclohexylurée.

Cet agent deshydratant présente l'avantage de n'être que peu sensible aux groupements hydroxyles non acides et n'impose donc pas la protection de ces groupes.

ZETZCHE le premier a étudié l'action du DCC sur les acides carboxyliques (85). TODD et KHORANA en ont repris l'étude pour l'appliquer à la synthèse de pyrophosphates (86, 87). L'emploi des carbodiimides a permis la préparation de nombreux esters ortho- et pyrophosphoriques, phosphates cycliques, polynucléotides, coenzymes, peptides et phosphoramidates. L'étude des carbodiimides a fait l'objet de revues (88) et d'une longue série d'articles (82, 89).

La détermination systématique des conditions opératoires optimales nous a conduit à mener la condensation de l'acide oestrone-phosphorique et de l'acide adénylique dans la diméthylformamide en présence d'un peu de pyridine à 40°. Une température plus élevée provoque la formation de produits secondaires dérivant de l'AMP (adénine et adénosine).

L'examen du mélange réactionnel brut par chromatographie sur papier (Solvant I) fait apparaître sept produits distincts dont cinq sont révélés à la lumière ultra-violette et dont trois donnent une réaction positive au test de Zimmermann. Une seule tache présente simultanément ces deux caractéristiques.

Ces produits ont été identifiés comme étant :

adénosine-diphosphate-adénosine (Rf 0,16)
acide adénylique (Rf 0,21)
oestrone-diphosphate-adénosine (Rf 0,48)
acide oestrone-phosphorique (Rf 0,58)
oestrone-diphosphate-oestrone (Rf 0,87)

et deux autres produits (Rf 0,05 et 0,30) non identifiés, ne contribuant que pour 4 % à la densité optique totale du mélange.

Une chromatographie en deux dimensions ne fait pas apparaître de tache nouvelle.

La réaction n'évolue plus après 24 h bien qu'il reste à ce moment un excès de DCC et que beaucoup d'AMP et d'acide oestrone-phosphorique n'aient pas réagi.

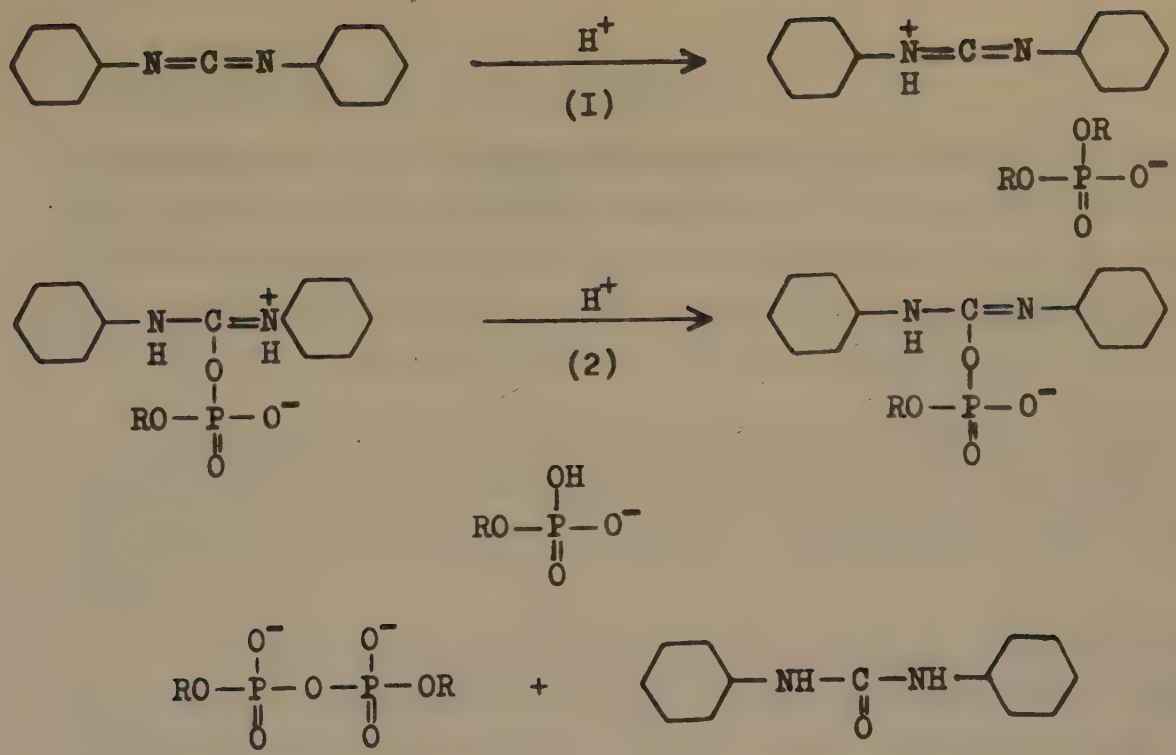
Le taux de conversion de l'acide adénylique en pyrophosphate dissymétrique n'est que de 30 %; il s'est formé 26 % d'acide P_1, P_2-diadénosine pyrophosphorique.

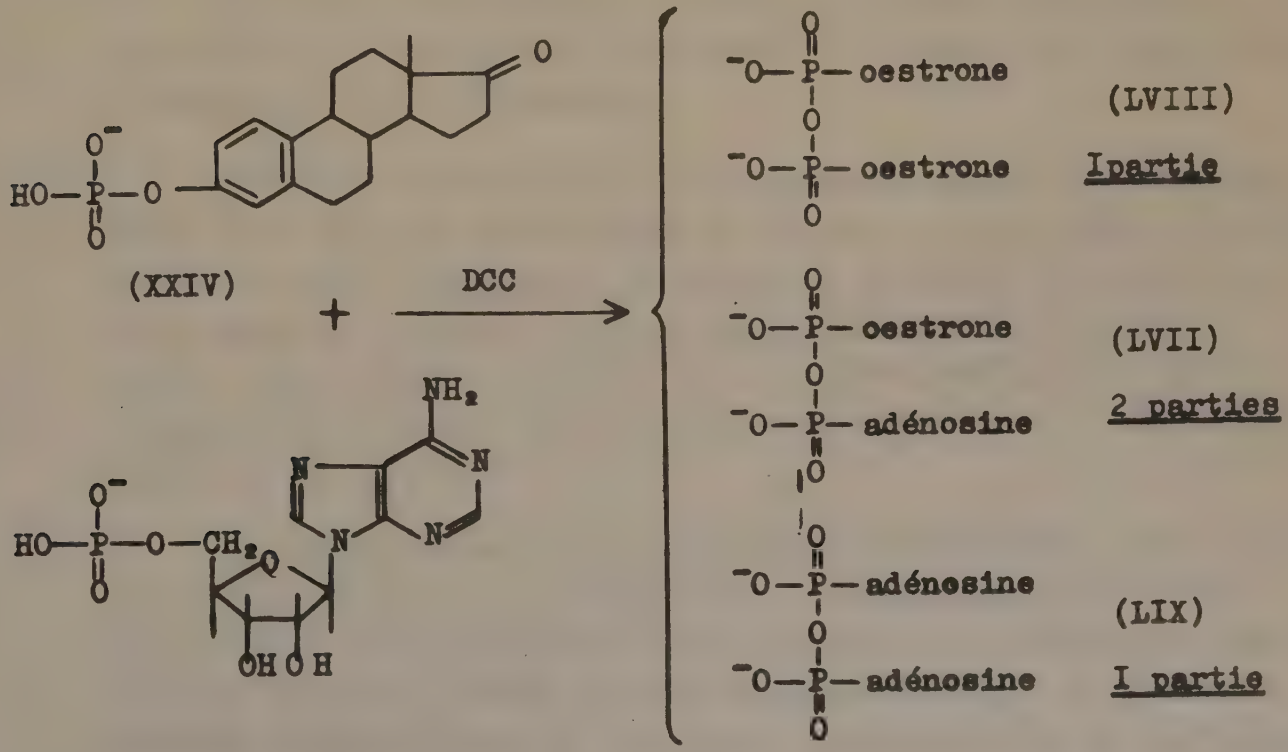
L'examen de ces chiffres est intéressant : La réaction consiste d'abord en l'attaque nucléophile de l'un des monoesters phosphoriques en présence, sur la forme protonée de la dicyclohexylcarbodiimide, pour donner le phosphate d'énol de l'urée correspondante; cet intermédiaire, non isolable, subit l'attaque nucléophile d'une seconde molécule d'ester pour donner le pyrophosphate (Tableau XII).

On attend donc, outre la formation du pyrophosphate dissymétrique recherché, celle des pyrophosphates symétriques d'oestrone et d'adénosine. Les deux esters phosphoriques étant employés en proportions stoechiométriques, la répartition des produits de la réaction devrait être statistique (I:2:I) (Tableau XII). Ce schéma est loin d'être respecté dans notre cas: nous constatons une forte sélectivité en faveur du pyrophosphate symétrique d'adénosine (Tableau XIV).

Le déroulement de la réaction dépend beaucoup du pouvoir

TABLEAU XI.


H+
(I)
H+
(2)


(XXIV)
DCC
oestrone
oestrone
(LVIII)
Ipartie
oestrone
adénosine
(LVII)
2 parties
adénosine
adénosine
(LIX)
I partie

nucléophile des anions en présence.

La prédominance de pyrophosphate symétrique d'adénosine parmi les produits de la réaction s'explique si l'on admet que l'acide oestrone-phosphorique est moins nucléophile que l'acide adénylique ou, plus généralement, que les acides phosphoriques sont d'autant moins nucléophiles qu'ils sont plus forts.

Dans cette hypothèse l'attaque de la forme protonée de la carbodiimide se fera préférentiellement par l'acide adénylique pour donner l'intermédiaire réactif correspondant (LX, R = adénosine).

L'anion de l'acide le plus fort, l'acide oestrone-phosphorique serait un nucléophile plus faible que l'anion de l'AMP et n'est pas compétitif avec ce dernier dans l'attaque de la forme protonée du DCC.

Le même phénomène doit orienter la seconde étape de la réaction si la différence de pouvoir nucléophile des deux esters phosphorique est suffisante.

La forte proportion de pyrophosphate symétrique observée dans notre cas est un argument en faveur de cette idée. En effet, s'il n'en était pas ainsi, et comme on se trouve en présence d'un excès de l'anion le moins nucléophile après le premier stade, nous devrions observer la formation préférentielle de l'acide (P_1-oestrone, P_2-adénosine)-pyrophosphorique au second stade de la réaction.

La condensation en pyrophosphate dissymétrique reste sans doute favorisée si la différence de pouvoir nucléophile des deux anions phosphoriques est plus faible et si l'on admet que la seconde étape est moins sensible à ce facteur que la première. KHORANA explique ainsi la formation préférentielle du diphosphopyridine nucléotide et la faible quantité de pyrophosphate de nicotinamidenucléoside symétrique présente dans la synthèse de TODD (89, 90).

Lorsque l'on opère en présence d'un peu de pyridine la proportion d'acide oestrone-phosphorique qui se trouve sous forme de son dianion est augmentée. Le dianion est un nucléophile plus puissant que le monoanion (89).

Le taux de conversion en pyrophosphate dissymétrique diminue si la proportion de pyridine augmente dans le mélange réactionnel, en même temps que diminue la solubilité des produits réagissants.

Il est intéressant de noter que la formation du pyrophosphate symétrique diadénosine est favorisée si la réaction est faite dans la diméthylformamide en l'absence de pyridine.

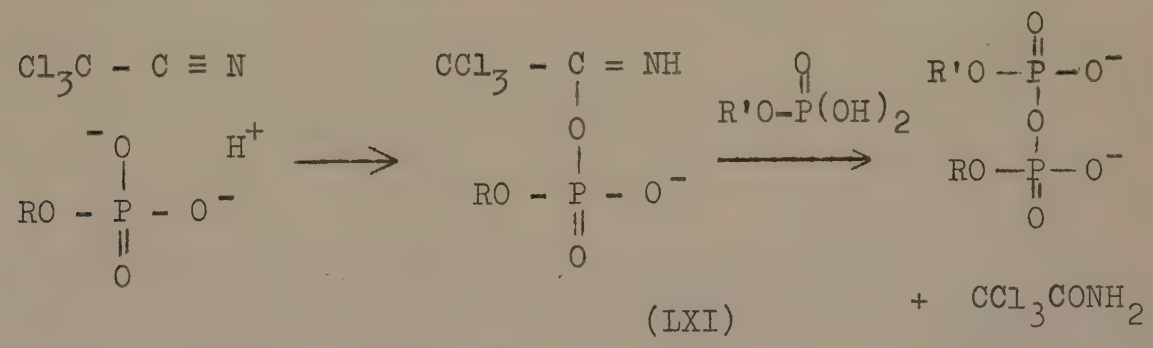
La présence d'une base plus forte que la pyridine, la triéthylamine, par exemple, inhibe la réaction presque totalement. Une base tertiaire forte a deux effets contraires; d'une part elle augmente la proportion de forme di-ionisée de l'acide oestrone-phosphorique, mais d'autre part elle oriente vers la gauche l'équilibre de protonation de la carbodiimide.

Influence de l'eau sur la réaction. La dicyclohexylcarbodiimide ne s'hydrolyse que lentement. L'attaque du réactif se fait préférentiellement par des produits ayant un caractère nucléophile plus prononcé, en général des acides, et de nombreuses synthèses ont été réalisées en milieu partiellement aqueux. Nous avons cependant constaté que la présence d'eau, même en faible quantité et avec un grand excès de DCC, diminuait le rendement. Nous nous sommes donc appliqués à sécher les produits **avant** réaction.

B.- En présence de trichloracétonitrile

Nous avons préparé le trichloracétonitrile par chloruration directe de l'acétonitrile par le chlore et le gaz chlorhydrique, suivant STEPANOV et SHIRIKOVA (91).

L'addition de réactifs nucléophiles et en particulier d'anions phosphoriques sur la liaison triple C≡N est rapide en présence d'une base tertiaire pour donner un phosphate d'imidoyle (LVI) non isolable. Cet intermédiaire réactif conduit à un pyrophosphate sous l'action d'une seconde molécule d'ester phosphorique.



(LXI)

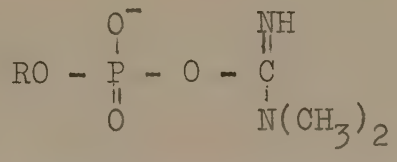
Cette méthode a été décrite par CRAMER et WEIMANN (92), elle a été utilisée entre autres pour préparer les pyrophosphates de géranyle et de farnésyle (93).

Nous avons utilisé le trichloracétonitrile dans les mêmes conditions que la dicyclohexylcarbodiimide, c'est-à-dire dans la diméthylformamide contenant 10 % de pyridine à 40°. La réaction est cependant plus rapide qu'en présence de DCC. La proportion de pyrophosphate dissymétrique P_1-oestrone, P_2-adénosine obtenue est supérieure (38 %); mais le produit prépondérant est le pyrophosphate symétrique d'adénosine en faveur duquel la sélectivité différentielle de la réaction est plus importante encore (53 %). Il ne reste que peu d'acide adénylique n'ayant pas réagi. Il n'y a pas de produits secondaires non attendus.

La condensation en pyrophosphate dissymétrique diminue comme dans le cas du DCC si l'on augmente la proportion de pyridine ou si l'on travaille en présence d'une base tertiaire plus forte. La proportion de pyrophosphate symétrique di-adénosine est encore augmentée si l'on opère en l'absence de pyridine.

C.- En présence de diméthylcyanamide

L'emploi de diméthylcyanamide a été proposé par TODD (72). Les dialkylcyanamides ($R_2N-C\equiv N$) sont en effet isomères des dialkylcarbodiimides et peuvent, comme ces dernières, fixer une molécule d'ester phosphorique pour donner un intermédiaire réactif :



(LXII)

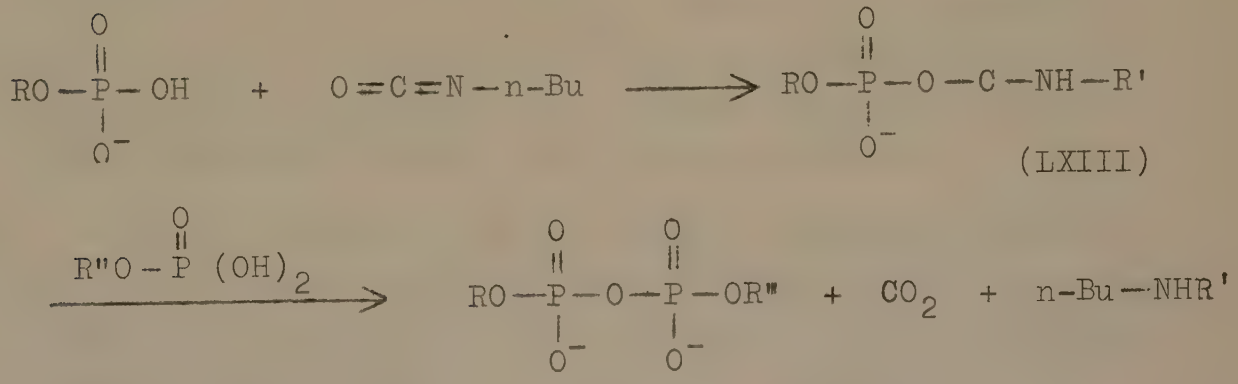
et conduire à la synthèse de pyrophosphates.

La diméthylcyanamide présente sur le DCC l'avantage d'une moins grande sensibilité à l'hydrolyse. Elle a pu, de ce fait, être utilisée en série nucléotide dans un mélange réactionnel contenant jusqu'à 30 % d'eau. La diméthylcyanamide est cependant beaucoup moins réactive que le DCC ou le trichloracétonitrile, ce qui oblige à travailler à 80°. Le solvant est constitué par de la diméthylformamide, de la pyridine et de l'eau (10/5/1). Dans ces conditions nous avons obtenu une proportion élevée de pyrophosphate symétrique d'adénosine. Beaucoup d'acide adénylique n'est pas entré en réaction. Le rendement en pyrophosphate dissymétrique est faible.

L'influence de l'eau sur la réaction nous semble cependant importante. En l'absence totale d'eau (diméthylformamide contenant 10 % de pyridine) les rendements obtenus sont de l'ordre de 30 % et comparables à ceux des méthodes précédentes.

D.- En présence d'isocyanate de n-butyle (17, 76)

Les monoanions et monoesters de l'acide phosphorique réagissent avec les isocyanates pour donner des anhydrides mixtes d'acides carbamiques et d'acides phosphoriques. Ces anhydrides réagissent avec une nouvelle molécule d'ester phosphorique pour donner un pyrophosphate.



On ajoute un excès du réactif à une solution des acides phosphoriques secs dissous dans la diméthylformamide et la pyridine à température ordinaire. Les résultats obtenus par cette méthode sont comparables à ceux de la méthode au DCC : le pic correspondant au pyrophosphate dissymétrique contient 30 % de l'adénosine de départ, les proportions de pyrophosphates symétrique di-adénosine et de produits secondaires non identifiés sont plus importants (respectivement 40 % et 10 %, il ne reste que 20 % d'AMP dans le mélange.

En résumé toutes ces méthodes directes impliquent l'addition nucléophile d'une molécule de monoester phosphorique sur une liaison CN multiple et activée pour donner un phosphate d'imidoyle intermédiaire, rapidement décomposé par une deuxième molécule d'ester phosphorique en pyrophosphate.

La proportion des trois pyrophosphates possibles, lorsque l'on met des quantités stoechiométriques d'acide oestrone-phosphorique et d'acide adénylique en présence du déshydratant, est loin de respecter le modèle statistique. La dissymétrie est dans tous les cas étudiés en faveur du pyrophosphate symétrique d'adénosine. L'acide oestrone phosphorique - plus fort - serait moins nucléophile que l'acide adénylique.

Compte tenu de ce fait, toutes ces méthodes directes, bien que simple à mettre en oeuvre, manquent totalement de spécificité, conduisent à des mélanges difficiles à séparer à l'échelle préparative et à de mauvais rendements.

II. CONDENSATIONS EN DEUX ETAPES PAR L'INTERMEDIAIRE DE PHOSPHORAMIDATES OU DE PHOSPHOMORPHOLIDATES

Pour orienter la réaction en direction du pyrophosphate dissymétrique il faudrait pouvoir isoler facilement un des intermédiaires figurant dans les méthodes précédentes. La plupart des tentatives faites dans cette voie ayant échoué (sauf dans le cas récemment décrit des phosphates de carbamyle) on a cherché à préparer des corps doués de propriétés analogues mais suffisamment stables pour pouvoir être isolés, prifiés et si possible conservés, tout en étant assez réactifs pour subir facilement l'attaque ultérieure d'une molécule d'ester phosphorique.

Une des idées directrices dans cette voie était de préparer des dérivés contenant une liaison P-N l'azote étant un élément fortement électronégatif, de manière à conférer un caractère électrophile à l'atome de phosphore qui devra subir une attaque nucléophile - une "phosphorolyse " - par un ester phosphorique convenablement choisi.

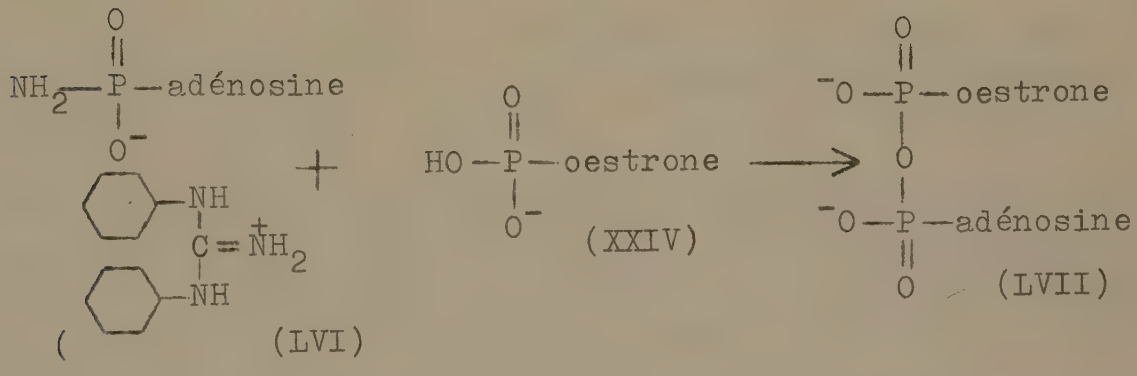
La possibilité qu'ont les systèmes biologiques d'utiliser les phosphoramidates, phosphate de créatine par exemple, est reconnue depuis longtemps (94).

L'emploi de phosphoramidates en particulier a été proposé par CLARCK et al. (19) ainsi que par CHAMBERS et KHORANA (20), mais ces corps étaient alors d'un accès difficile. Le problème de leur préparation a été résolu (53). Les phosphomorpholidates nucléotidiques et leur application à la synthèse de pyrophosphates ont fait depuis l'objet d'études systématiques qui ont conduit KHORANA à la synthèse de plusieurs coenzymes (54, 55), dont le coenzyme A (95) (*).

(*) Signalons encore que LYNEN (96) et EGGERER (97) utilisent cette méthode dans leurs travaux sur la biosynthèse des terpènes.

Les acides phosphoramidiques sont stables sous la forme de leurs sels mais s'hydrolysent facilement en solution aqueuse acide (98).

L'attaque anionique par un monoester phosphorique sur l'atome de phosphore rendu électrophile devient facile :

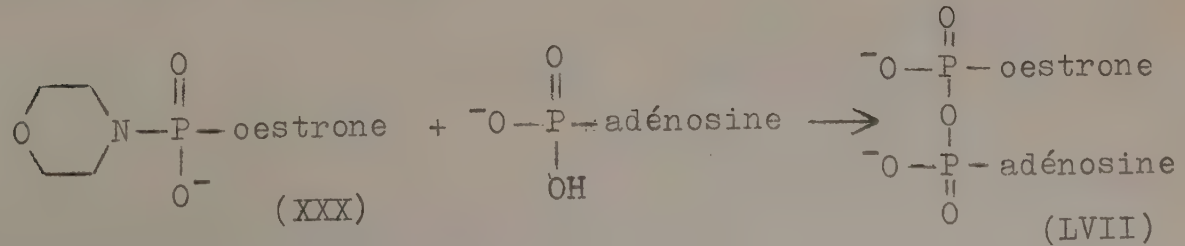


(LVI) (XXIV) (LVII)

L'adénosine-5'phosphoramidate de dicyclohexyl-1,3 guanidinium (LVI) n'est pas soluble dans la pyridine, sa "phosphorolyse" a été réalisée en suspension dans la pyridine et la diméthylformamide à 40°. Le pyrophosphate P_1-oestrone, P_2-adénosine est le produit prédominant. Il est accompagné d'un reste de phosphoramidate et d'un peu d'AMP mais aussi des deux pyrophosphates symétriques di-oestrone et di-adénosine !

La réaction doit être faite avec des produits et des solvants bien secs. Le taux de condensation diminue lorsque la dilution augmente.

Nous avons également tenté la synthèse par la méthode symétrique, en condensant le phosphomorpholidate d'oestrone (XXX) avec l'acide adénylique.



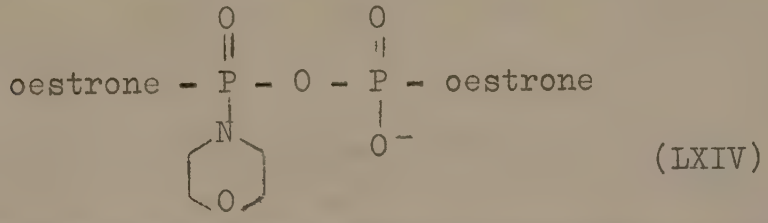
(XXX) (LVII)

Le phosphormorpholidate d'oestrone est très soluble dans la pyridine mais sa réactivité est pratiquement nulle à froid ce qui nous a obligé de travailler à la température de 80°. Le solvant utilisé est la pyridine anhydre.

Dans ce cas encore le pyrophosphate dissymétrique prédominent, est accompagné des deux pyrophosphates symétriques.

La présence, dans le produit brut de la dernière condensation par exemple, du pyrophosphate symétrique di-oestrone peut s'expliquer (19) :

- soit par l'action d'une molécule de phosphomorpholidate sur une seconde molécule, grâce à son dernier hydroxyle libre pour donner le pyrophosphate intermédiaire P_1-morpholine, P_1, P_2-di-oestrone, facilement hydrolysé ensuite .



(LXIV)

- soit par une hydrolyse partielle préalable du phosphomorpholidate en phosphate, suivie de l'attaque normale d'une autre molécule du phosphomorpholidate. Cette seconde hypothèse nous semble moins probable vu les conditions expérimentales de la réaction.

La présence de l'autre pyrophosphate symétrique, non mentionné dans les publications, reste inexpliquée.

Les méthodes décrites dans ce second groupe ne se sont donc révélées, ni quantitatives, ni entièrement spécifiques. Bien que supérieurs à ceux des méthodes de condensation directes, les rendements ne dépassent pas 45 % et sont encore trop faibles pour permettre d'éviter la séparation chromatographique.

III. CONDENSATION EN DEUX ETAPES PAR REACTION DE SUBSTITUTION D'ANIONS

L'étude de la substitution contrôlée des anions phosphoriques d'un pyrophosphate mixte fait l'objet du prochain chapitre. Ici nous n'envisagerons cette réaction que dans le cadre de la comparaison des méthodes, aussi nous bornerons nous à indiquer les résultats obtenus :

0,2 mM d'acide oestrone-phosphorique sont convertis quantitativement en pyrophosphate P_1-diphényle, P_2-oestrone, puis par addition d'une quantité stoechiométrique d'un sel d'AMP en solution dans la pyridine en pyrophosphate P_1-oestrone, P_2-adénosine. Le pyrophosphate étant de loin le produit prédominant de la réaction, il nous a été possible de le précipiter en milieu acide et de l'isoler à l'état pur sans qu'il ait été besoin de le chromatographier.

Le rendement en pyrophosphate isolé atteint 70 % dans ces conditions.

Cette méthode, étant incomparablement plus sélective que toutes les précédentes, a été retenue pour la préparation des autres stéroyl-nucléotides (Chapitre VI).

NOUVELLE METHODE DE CONDENSATION UTILISANT LES CHLORO-MORPHOLINO-PHOSPHATES

La facilité d'accès au chloro-morpholino-phosphate de déhydro-épiandrostérone décrit au chapitre II et la réactivité que l'on en attend, suggèrent son emploi pour la préparation sélective de pyrophosphates dissymétriques. L'attaque nucléophile du chloromorpholidate par un ester phosphorique doit en effet conduire au morpholino-pyrophosphate (LXV). L'hydrolyse aisée des groupes morpholyles doit conduire au pyrophosphate (LXVI).

L'étude de cette nouvelle méthode de condensation a été entreprise et les premiers résultats obtenus confirment nos prévisions. Le chloro -morpholino-phosphate de déhydroépiandrostérone dissous dans de la pyridine anhydre réagit avec le monosel de tri-n-octylammonium de l'AMP. L'examen périodique du mélange réactionnel par chromatographie sur couche mince de silice montre que la totalité du chloromorpholidate a réagi après 8 h à 40°.

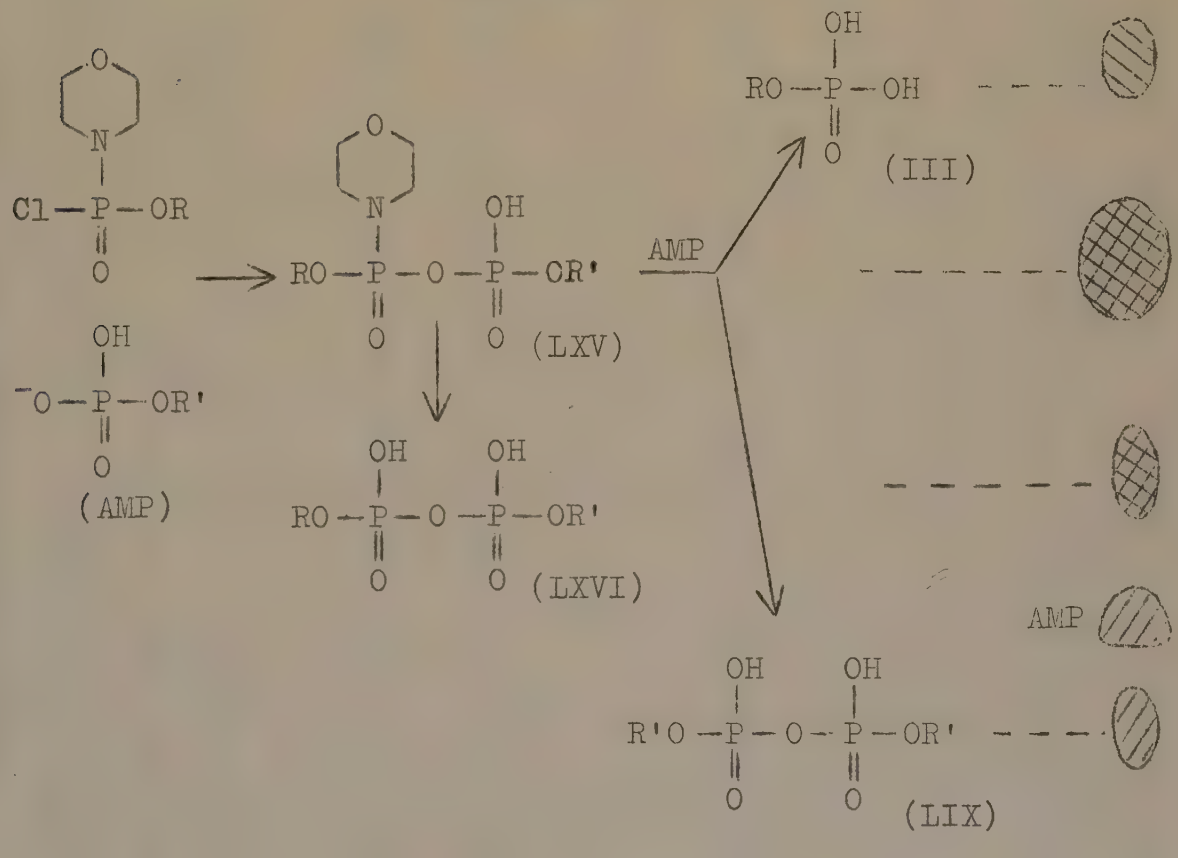
Le mélange réactionnel est ensuite analysé par chromatographie sur papier. La déhydroépiandrostérone est révélée comme l'oestrone, grâce au test de Zimmermann.

L'examen du chromatogramme développé, en lumière ultraviolette, fait apparaître trois taches correspondant à trois produits nouveaux. Deux de ces produits sont également révélés par le test de Zimmermann; l'un d'eux est de loin le constituant majeur du mélange et présente un Rf de 0,74 supérieur comme on s'y attendait pour le morpholino- pyrophosphate (LXV) à celui du pyrophosphate P_1-déhydroépiandrostérone, P_2-adénosine (LXVI) (Rf=0,52)préparé par ailleurs. Le second produit en proportion très faible, a été identifié avec le pyrophosphate (LXVI). Enfin il s'est formé un peu de pyrophosphate symétrique di-adénosine, sans doute au détriment du morpholino-pyrophosphate (LXV) encore réactif dans les conditions de l'expérience (voir page 70).

Sous réserve que l'hydrolyse sélective du groupe morpholyle soit aisée, cette réaction constitue une variante nouvelle de la méthode classique de condensation d'un acide phosphorique avec le chlorure d'un autre acide phosphorique, méthode qui est généralement compromise par la difficulté que présente la préparation de ces chlorures, mais qui reprendrait ainsi toute sa valeur synthétique dans les cas où l'accès aux chloromorpholinophosphates est facile.

chromatogramme

TABLEAU



×

ROH = déhydroépiandrostérone

produits révélés au test de Zimmermann

R'OH = adénosine

produits révélés à la lumière ultra-violette

TABLEAU XIII

ANALYSE CHROMATOGRAPHIQUE SUR ECHANGEURS D'IONS

Méthode → / corps élués	A) (0,003 mM*) DOT	A) DOT corr.	A) %	B) (0,045 mM*) DOT	B) DOT corr.	B) %	C) (0,05 mM*) DOT	C) DOT corr.	C) %	D) 0,05 mM*) DOT	D) DOT corr.	D) %	E) (0,047 mM*) DOT	E) DOT corr.	E) %	F) (0,05 mM*) DOT	F) DOT corr.	F) %
phosphor-amidate l'adénosine													125	125	20			
AMP	198	198	40,5	39	39	6,4	142	142	20	112	112	20,5	94	94	15	93	93	36,5
yrophospha- P_1,P_2 di- adénosine (ADPA) **	112	128	26,2	286	328	53,5	214	246	35	194	220	40	99	114	18	38	43	17
yrophospha- e 1-oestrone 2-adénosine (ODPA) ***	118	145	29,6	192	236	38,5	205	252	36	133	163	30	244	300	46	86	105	41,5
autres produits	18	18	3,7	10	10	1,6	70	70	10	53	53	9,5				13	13	5

* quantité d'adénosine présent dans le mélange porté sur la colonne

** D.O.T. corrigée= D.O.T. x 1,15 $\left[\varepsilon_{ADPA} = 2\,\varepsilon_{AMP} \cdot (100 - 13,6)\right]$

*** D.O.T. corrigée= D.O.T. x 1,23 $\left[\varepsilon_{ODPA} = (\varepsilon_{oestrone} + \varepsilon_{AMP}) \cdot (100 - 23 + 5)\right]$

D.O.T. = densité optique totale de l'éluant correspondant à un pic

TABLEAU XIV

RESULTATS DE L'ANALYSE CHROMATOGRAPHIQUE PAR ECHANGE D'IONS

METHODE	AMP-5'	pyrophosphate di-adénosine	pyrophosphate P_1-oestrone P_2-adénosine	Autres produits absorbant à 260 mμ	Acide oestrone-phosphorique	Pyrophosphate di-oestrone
A.- Dicyclohexylcarbodiimide	40,5	26,2	29,2	3,7	+	+
B.- Trichloracétonitrile	6,4	53,5	38,5	1,6	+	+
C.- Diméthylcyanamide	20	35	36	10	+	+
D.- Isocyanate de n-butyle	20,5	40	30	9,5	+	+
E.- Phosphoramidate d'adénosine	15	18	46	20 ($AMP-NH_2$)	+	+
F.- Phosphomorpholidate d'oestrone	12,5	35,5	45	7	+	+
G.- Pyrophosphate P_1-oestrone, P_2-diphényle			70			

CHAPITRE VI

SYNTHESE DE STEROYL-NUCLEOTIDES ET POLYPHOSPHATES DE STEROÏDES PAR SUBSTITUTION D'ANIONS

Le premier coenzyme nucléotidique synthétique, l'adénosine diphosphate (ADP) a été préparé en traitant l'O-adénosine-5', O-benzyle-phosphate d'argent par le chlorure de dibenzyle-phosphoryle. Les trois groupes benzyle sont ensuite hydrogénolysés (70,71). Plusieurs produits de grande importance biologique, parmi lesquels le flavine-adénine-dinucléotide (FAD) (99) et l'uridine-diphosphate-glucose (UDPG) (100) ont pu être obtenus par cette méthode lorsque la préparation des phosphochloridates de nucléosides intermédiaires a été rendue possible.

Pour résoudre ce problème TODD et ses collaborateurs avaient entrepris une série d'expériences sur des modèles simples. C'est ainsi qu'ils ont tenté d'obtenir le chlorure de dibenzyl-phosphoryle par action du chlorure de thionyle sur le dibenzyl-phosphate de potassium suivant une méthode décrite: le corps obtenu était en fait l'acide tétrabenzyl-pyrophosphorique. TODD note aussitôt que ces expériences, qui semblent limiter une voie d'accès aux phosphochloridates, ne constitue pas nécessairement un handicap sur la voie des synthèses de pyrophosphates mais ouvrent au contraire de nouvelles perspectives: les tétra-esters pyrophosphoriques sont en effet des anhydrides d'acides et par conséquent des agents phosphorylants (101, 79). La phosphoryla-

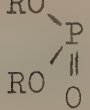
tion d'alcools et d'amines par l'acide tétrabenzylpyrophosphorique était déjà connue (8, 102, 103, 104).

En présence de deux molécules d'une base tertiaire, le tétraphényl-pyrophosphate réagit rapidement et quantitativement avec l'acide dibenzyle-phosphorique pour donner l'acide tétrabenzyl-pyrophosphorique (101, 79) (Tableau XIV).

La réaction se fait en deux temps :

De manière générale, lorsqu'un pyrophosphate mixte de deux acides phosphoriques subit l'attaque nucléophile de l'anion d'un acide plus faible que l'un des deux acides liés, l'anion du plus fort des deux acides de l'anhydride mixte est échangé contre l'anion attaquant.

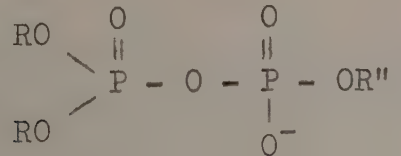
Dans le cas d'un anhydride de deux diesters phosphoriques différents la phosphorylation est faite de manière prédominante ou même exclusive par le plus faible des deux acides. Le groupe



ne peut fixer un groupe nucléophile attaquant qu'avec expulsion d'un autre groupe. L'attaque se fera de préférence de manière à expulser l'acide phosphorique ayant l'anion le plus stable.

L'acide pyrophosphorique, les mono et diesters symétriques n'ont pratiquement pas de propriétés phosphorylantes en milieu basique: la présence de charges négatives rend difficile l'attaque des réactifs nucléophiles. La réaction d'échange d'anions devient possible avec les triesters.

Remarquons que la méthode classique de synthèse des pyrophosphates par les phosphochloridates exige la protection préalable des hydroxyles, y compris ceux des phosphates. Les pyrophosphates obtenus seront donc au moins trisubstitués et du type :



Ces anhydrides sont réactifs et permettent la réaction d'échange d'anions, qui serait ainsi responsable des faibles rendements obtenus dans les premières synthèses de l'ADP (70, 71) et de l'ATP (71). La méthode classique est donc sérieusement limitée par des réactions secondaires d'échange.

Pourtant la seule application synthétique en série nucléotidique qui ait suivi l'étude de la réaction modèle décrite plus haut, est la synthèse, en même temps que d'autres méthodes, du pyrophosphate symétrique P_1, P_2 di-uridine. Le rendement obtenu est faible (80). On introduisait la partie nucléotidique sous forme d'ester benzyl, nucléoside-phosphorique, l'action de l'acide tétraphénylpyrophosphorique conduisait au pyrophosphate P_1-benzyl, P_1-nucléoside, P_2-diphényl-phosphorique tétrasubstitué très réactif. On ne savait pas contrôler l'évolution de la réaction et en séparer les deux stades, l'accès aux pyrophosphates dissymétriques était particulièrement compromis.

C'est pourquoi cette voie prometteuse a été abandonnée lorsqu'on a su préparer les phosphites de nucléosides et de benzyle et les phosphochloridates correspondants (105, 106); l'utilisation des carbodiimides a définitivement détourné les chercheurs de cette méthode.

Ce n'est qu'en 1960 que MICHELSON, reprenant l'étude de la réaction d'échange, réussit à exploiter en tant que méthode synthétique ce qui n'avait longtemps été qu'une réaction secondaire gênante (107).

MICHELSON fait agir le chlorure de diphényl-phosphoryle sur le nucléotide en présence d'une base tertiaire forte et encombrée, il obtient le pyrophosphate P_1-nucléoside, P_2-diphényle.

Cet intermédiaire possède la propriété de n'être que peu réactif et relativement stable en l'absence d'une base tertiaire faible comme la pyridine.

Par ailleurs l'attaque d'une espèce nucléophile, en présence de pyridine, est univoque, l'acide diphényl-phosphorique est

incomparablement plus fort que l'acide nucléoside-phosphorique et son anion - le plus stable - sera seul échangé.

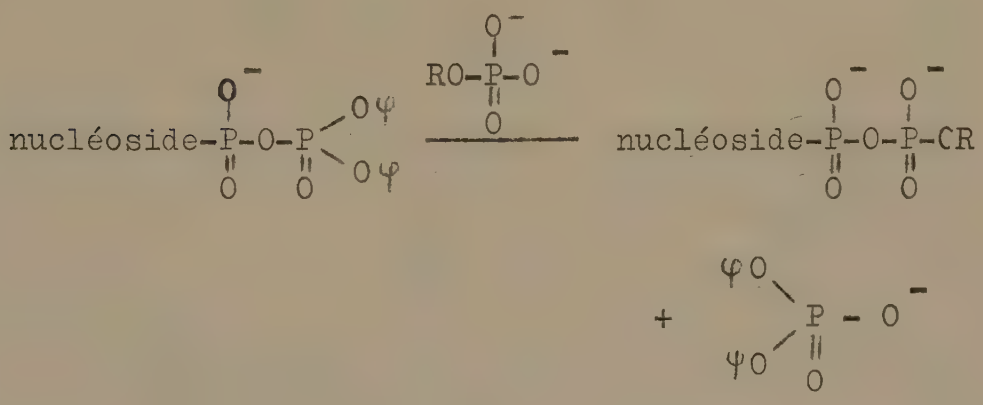


Tableau XIV

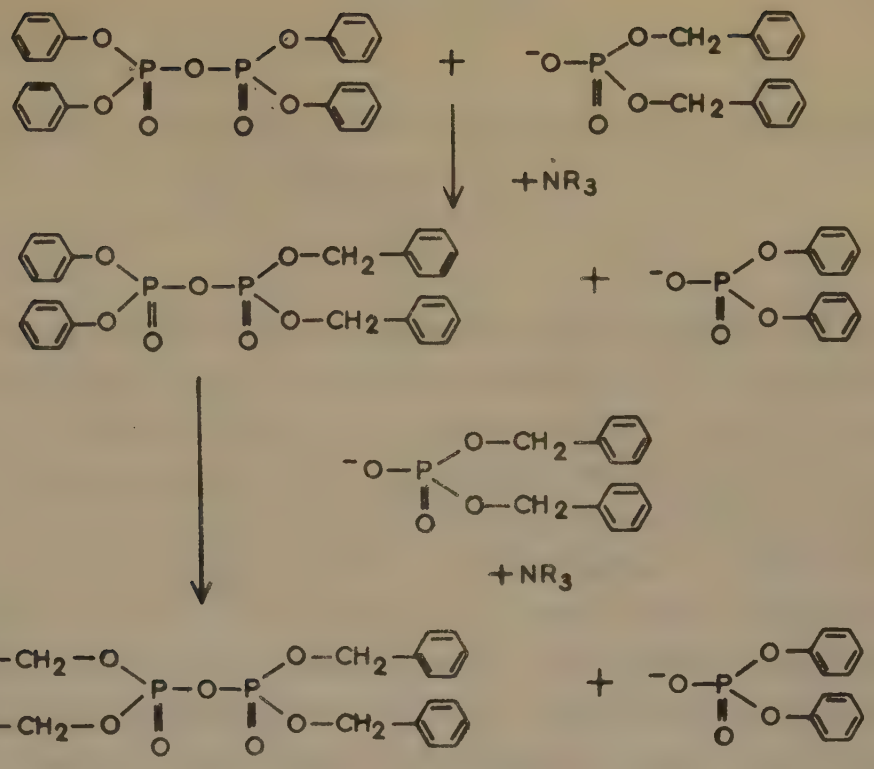
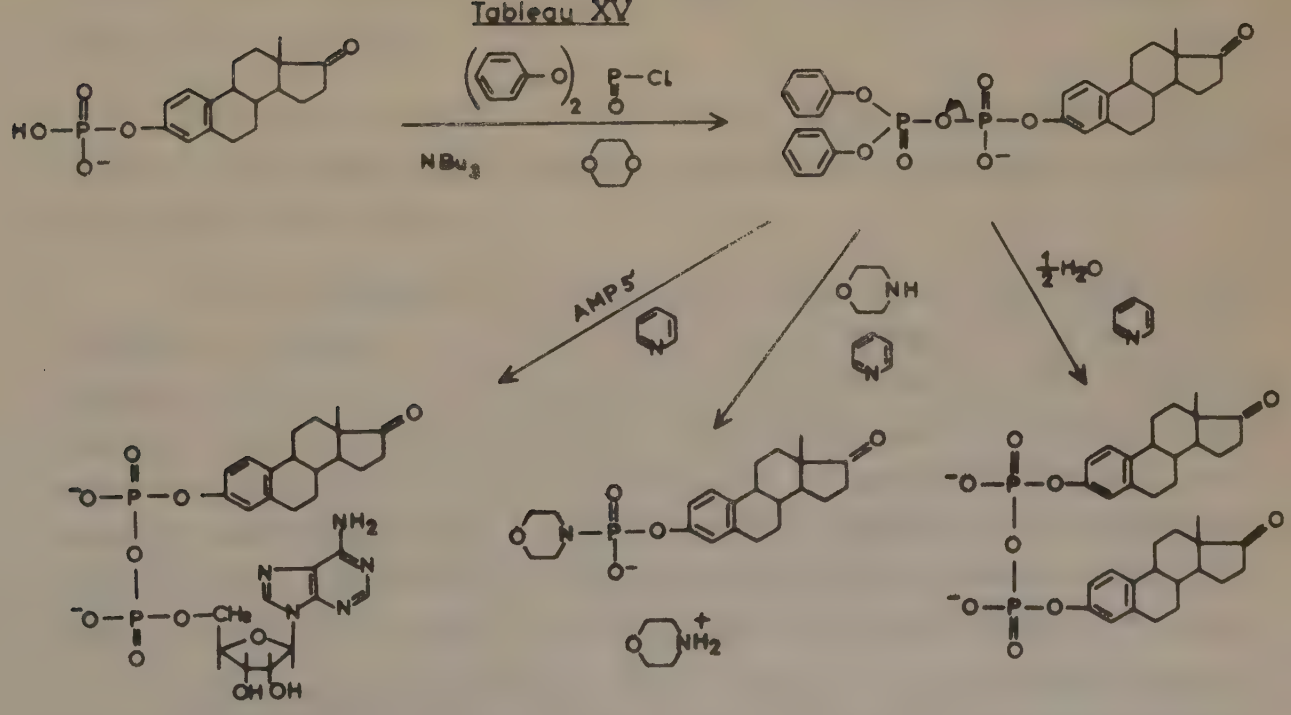


Tableau XV



APPLICATION A LA PREPARATION DU PYROPHOSPHATE P_1-OESTRONE, P_2-ADENOSINE

L'action du chlorure de diphényle-phosphoryle en présence de tri-n-butylamine sur l'oestrone-phosphate de tri-n-butylammonium sec, en solution dans le dioxane anhydre conduit quantitativement et instantanément au pyrophosphate P_1-oestrone, P_2-diphényle. La réaction, légèrement exothermique, est déjà complète après une minute. L'emploi de la triéthylamine au lieu de la tri-n-butylamine conduit à de moins bons résultats. L'anhydride trisubstitué obtenu est très réactif en présence de pyridine. L'acide diphényl-phosphorique, dont l'anion est très stable, est facilement déplacé par l'acide adénylique, plus faible que lui, pour donner naissance à un anhydride moins réactif (Tableau XV).

Le deuxième stade de la condensation se fait sans isolement du pyrophosphate intermédiaire qui est cependant lavé à l'éther anhydre pour éliminer le léger excès de chlorure de diphényl-phosphoryle utilisé.

L'attaque nucléophile par le sel de tri-n-octylammonium de l'acide adénylique est rapide à température ordinaire en présence de pyridine anhydre.

Il est nécessaire de travailler dans des conditions rigoureusement anhydres car un demi équivalent d'eau suffit pour provoquer l'hydrolyse d'une moitié de l'anhydride en acide diphényl-phosphorique et en acide oestrone-phosphorique qui réagira, en présence de pyridine, avec le reste de l'anhydride présent pour donner quantitativement le pyrophosphate symétrique di-oestrone (Tableau XV). Il convient donc de sécher soigneusement les produits et solvants ainsi que les pipettes et récipients utilisés.

Le mélange réactionnel brut, analysé par chromatographie sur papier, est constitué essentiellement par du pyrophosphate P_1-oestrone, P_2-adénosine.

Les produits bruts, nucléotides et stéroyl-nucléotides sont précipités par de l'éther anhydre à l'état de sels de tri-n-butyl-ammonium. L'oestrone-diphosphate-adénosine précipite lorsque l'on acidifie la solution aqueuse de ces sels. Un peu de méthanol facilite la cristallisation. Les eaux-mères sont neutralisées à la soude, l'amine libérée extraite à l'éther est reconnue comme étant la tri-n-butylamine.

En utilisant des proportions stoechiométrique des deux esters phosphoriques on obtient le pyrophosphate disymétrique avec un rendement déjà satisfaisant (70 %) tout en évitant la séparation chromatographique.

L'étude de la condensation en fonction d'un excès d'acide adénylique a été faite en vue de rendre aussi complète que possible la conversion du phosphate de stéroïde en pyrophosphate. Un excès de 0,2 à 0,25 équivalents d'AMP suffit pour cela. Un excès plus important n'améliore guère le rendement et rend l'isolement su produit plus difficile.

La concentration du mélange réactionnel apparaît comme un facteur très important, il convient de travailler en milieu aussi concentré que possible.

Dans une expérience préparative (3 mM d'acide oestrone-phosphorique) nous avons employé 1,2 équivalents d'AMP. Le rendement a pu être porté à 90 %, résolvant ainsi le problème posé par la synthèse des stéroyl-nucléotides.

Nous avons également préparé l'oestrone-diphosphate-adénosine par action de l'acide oestrone-phosphorique sur le pyrophosphate P_1-adénosine, P_2-diphényle.

Le pyrophosphate P_1-oestrone, P_2-adénosine est décrit page 54.

AUTRES STEROYL-NUCLEOTIDES

Nous avons utilisé la même méthode de condensation pour la préparation d'une série de stéroyl-nucléotides (LXVII) groupant dans la même molécule l'adenosine et un stéroïde oestrogène (R=oestradiol, en -3), androgène (R=testostérone, déhydroépiandrostérone), ou un cortico-stéroïde (R=prédnisolone, hydrocortisone, dexaméthasone).

Les acides prédnisolone-21-phosphorique (LXVIII), hydrocortisone-21-phosphorique (LXIX), et dexaméthasone-21-phosphorique (LXX) nécessaires, nous ont été obligeamment fournis par N.V. Organon (Oss) sous la forme de sels de sodium, il nous a suffi de les faire passer sur une colonne d'échangeur Amberlite IRC 50 (H^+) pour obtenir les phosphates di-hydrogène utilisés.

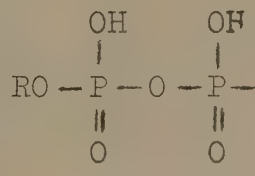
Les produits précipités directement sont souillés par un peu d'AMP, leur purification est généralement moins aisée que celle du pyrophosphate P_1-oestrone, P_2-adénosine. Cette impureté peut cependant être éliminée par précipitation répétée du produit dans du méthanol et de l'eau mais au prix de pertes importantes.

Nous décrivons les stéroyl-nucléotides obtenus par leur spectre ultra-violet et par leur courbe de dispersion rotatoire ou de dichroïsme circulaire. La position et l'intensité des maxima de ces courbes peuvent en effet être calculées en faisant la somme des courbes correspondantes relatives au stéroïde et au nucléotide engagés. Nous avons rassemblé dans le tableau XVI les valeurs calculées et les valeurs observées pour ces caractéristiques. L'AMP ne possédant pas de dichroïsme circulaire propre, on s'attend à retrouver pour le pyrophosphate le dichroïsme du stéroïde, ce point est vérifié par l'expérience.

Nous constatons aussi que les courbes de dispersion rotatoire correspondent assez bien aux courbes calculées. Il n'en est pas de même du coefficient d'extinction moléculaire observé pour le maximum de la courbe d'absorption dans l'ultra-violet

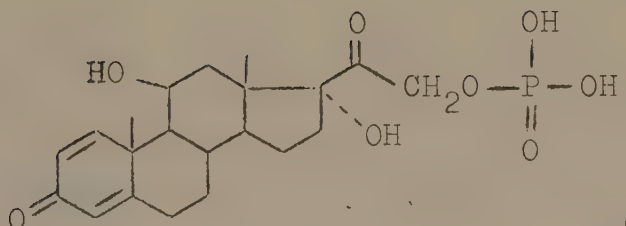
qui est toujours inférieur (de 8 à 23 %) au coefficient calculé (voir p. 54).

Nous complètons la caractérisation de ces produits en dénombrant sur le spectre de R.M.N., les groupes méthoxyles portés par le phosphore après traitement du pyrophosphate par le diazométhane.



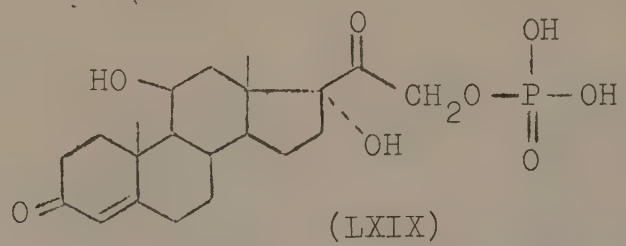
dénosine

(LXVII)



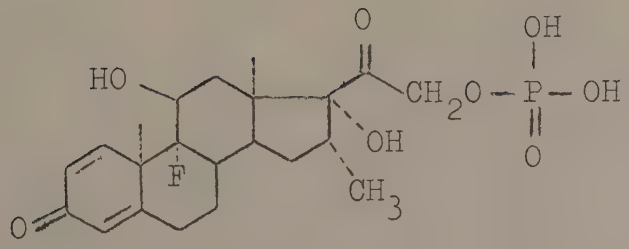
prédnisolone

(LXVIII)



(LXIX)

hydrocortisone



(LXX)

dexaméthasone

TABLEAU XVI

SREROYL-NUCLEOTIDES	Analyse P Calc: % Tr:	U.V. (H_2O) λmax (mμ)	ε	D.C. (Tampon) λmax (mμ)	$\Delta\varepsilon$	D.R. λ_{max} (mμ) $[\alpha]max.$
Oestrone-diphosphate-adénosine	8,90	Calc: 260	16000	Calc: 290	+3,85	Calc: 205° 1115°
$C_{28}H_{35}N_5O_{11}P_2$, 1 H_2O = 697,57	8,93	Tr : 260	12600	Tr: 292	+3,78	Tr : 205° 1200° (MeOH)
Oestradiol-3-diphosphate-adénosine	8,87	Calc: 260	16000	-		-
$C_{28}H_{37}N_5O_{11}P_2$, 1 H_2O = 699,60	8,61	Tr : 260	14200	-		-
Testostérone-diphosphate-adénosine	8,36	Calc: 250	25100	Calc: 305	-1,78	
$C_{29}H_{43}N_5O_{11}P_2$, 1 H_2O = 716,63	8,40	Tr : 250	23200	Tr : 306	-1,77	
Déhydroépiandrostérone-diphosphate-adénosine	8,66	Calc: 260	15400	Calc: 292	+3,23	
$C_{29}H_{41}N_5O_{10}P_2$, 1 H_2O = 715,63	8,12	Tr : 260	14800	Tr : 292	+3,08	
Prednisolone diphosphate-adénosine	7,86	Calc: 256	26120			Calc: 312,5 985°
$C_{31}H_{41}N_5O_{14}P_2$, 1 H_2O = 787,65	7,94	Tr : 255	23600			Tr : 312,5 905° (Tampon)
Hydrocortisone-diphosphate-adénosine	7,84	Calc: 252	20800	Calc: 290	+2,37	
$C_{31}H_{43}N_5O_{14}P_2$ 1 H_2O = 789,68	7,62	Tr : 252	18600	Tr : 290	+2,31	
Dexamethasone-diphosphate-adénosine	7,65	Calc: 256	23650	Calc: 292	+3,2	
$C_{32}H_{42}O_{14}P_{21}$, 1 H_2O = 819,66	7,58	Tr : 257	26000	Tr : 291	+2,5	

PYROPHOSPHATE SYMETRIQUE P_1, P_2-DI-OESTRONE

On peutévidemment remplacer le nucléotide par tout autre ester phosphorique ou même tout autre acide pour déplacer l'anion diphényl-phosphorique dans le pyrophosphate (LXXI), pourvu que l'acide employé soit moins fort que l'acide diphényl-phosphorique. On aura ainsi accès à toute une gamme de nouveaux dérivés d'hormones stéroïdes, phosphates de carboxyle, de sulfonyle, de phosphonyle, polyphosphates .... et à n'importe quel pyrophosphate disubstitué symétrique ou non dont la préparation pourrait constituer un des prolongements de ce travail.

On pourra donc envisager de réunir des produits biologiquement actifs très divers dans la même molécule.

Nous avons préparé le pyrophosphate P_1, P_2-di-oestrone (LVIII) afin de l'identifier au produit repéré sur les chromatogrammes dans les condensations décrites au chapitre IV et V. Il suffit pour cela d'ajouter une demi-molécule d'eau et de la pyridine à une solution de pyrophosphate (LXXI) dans du dioxane. On provoque ainsi l'hydrolyse de la moitié de ce pyrophosphate en acide oestrone-phosphorique qui à son tour déplacera l'anion diphényl-phosphorique dans le reste de pyrophosphate présent. On précipite les sels de barium de l'acide P_1, P_2-dioestrone-pyrophosphorique, le produit cristallise facilement, le rendement est de 87 %.

PHOSPHOMORPHOLIDATES DE STEROÏDES

Une amine, ou un acide aminé dont le groupe carboxylique aura été protégé au préalable, réagiront sur le pyrophosphate (LXXI) pour donner un phosphoramidate.

C'est ainsi que nous avons préparé l'oestrone-phosphomorpholidate de morpholinium qui nous a servi à identifier le phosphomorpholidate de carboxamidinium (chapitre II). On traite une solution du sel de tri-n-butylammonium du pyrophosphate (LXXI) dans le dioxane par une solution anhydre, à volumes égaux, de morpholine et de pyridine. La réaction est quantitative, on évapore les solvants et on reprend par de l'acétone, le produit précipite lorsque l'on refroidit cette solution. Le diphényl-phosphate de morpholinium, qui se forme simultanément est facilement éliminé par recristallisation. Les spectres infra-rouge et de R.M.N. sont discutés au chapitre II.

La solubilité de ce produit est particulièrement remarquable puisqu'elle couvre une large gamme de solvants depuis l'eau jusqu'à l'éther.

Le déhydroépiandrostérone-morpholino-phosphate de morpholinium (XXXIII) a été préparé de la même manière.

ETUDE PAR RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE DES GROUPES METHOXYLES LIES AU PHOSPHORE

Nous avons déjà indiqué la valeur des dérivés méthoxylés pour l'identification et la caractérisation des acides phosphoriques, nous voulons montrer dans ce chapitre que leur étude par R.M.N. est particulièrement fructueuse de ce point de vue.

Dans tous les cas que nous avons étudiés, tous les hydroxyles acides libres portés par le phosphore ont été aisément méthylés par le diazométhane, même lorsque leur encombrement stérique était important. Des solvants divers peuvent être employés pour cela, nous avons employé indistinctement le dioxane ou le chloroforme, la réaction se fait également sur une suspension du produit à méthyler dans un de ces solvants.

La résonance magnétique nucléaire des protons dans les produits phosphorés a fait l'objet de revues récentes (108); les groupes méthoxyles sur le phosphore ont été étudiés plus particulièrement par MAVEL (109).

Les signaux dus aux groupes méthoxyles portés par le phosphore apparaissent entre 210 et 240 cps, sont dédoublés par ce dernier et se distinguent ainsi des autres groupes méthoxyles présents dans la même mplécule (voir par exemple la figure 13).

A) Déplacements chimiques

La position des signaux de résonance du groupe CH_3-O-P est fonction des autres substituants du phosphore, MAVEL le vérifie pour des substituants d'électronégativité très différente (109).

Le tableau XVIII montre, pour un même acide, ici le phosphate de déhydroépiandrostérone et de méthyle, le déplacement des signaux en fonction du troisième substituant. Ces déplacements

dépendent certainement de plusieurs facteurs dont l'électronégativité et l'anisotropie diamagnétique des substituants.

La position des signaux varie peu avec la nature du stéroïde dans les phosphates de stéroïdes et de diméthyle (Tableau IV) ou dans les méthyl-phosphonates de stéroïdes et de méthyle (Tableau XVII), sauf pour les stéroïdes phosphorylés sur un cycle aromatique, le signal est alors légèrement déplacé vers les fréquences plus faibles. L'exemple de l'acide oestradiol-bis-méthyl-phosphonique est particulièrement intéressant puisque l'on distingue, sur le spectre de son dérivé diméthylé (Fig. 7) les deux groupes méthyl-phosphoniques fixés sur la même molécule en des positions différentes. Les deux groupes de signaux sont entièrement séparés et centrés à 219 et 222,5 cps, le dédoublement secondaire du signal à 219 cps, traité au § C, permet de confirmer son attribution au groupe méthyl-phosphonate de méthyle en -17

Le tableau XIX offre quelques exemples supplémentaires de déplacement des signaux des méthoxyles en fonction des autres substituants du phosphoryle (61); cet effet est très net lorsque l'on remplace un groupe benzyle par un groupe phényle, un second groupe phényle augmente encore le déplacement vers les fréquences plus faibles; ces quelques exemples suffisent à montrer l'intérêt qu'aurait une étude systématique de cet effet et en particulier de l'influence des substituants en para sur le cycle aromatique sur le déplacement chimique des méthoxyles, liés au phosphore.

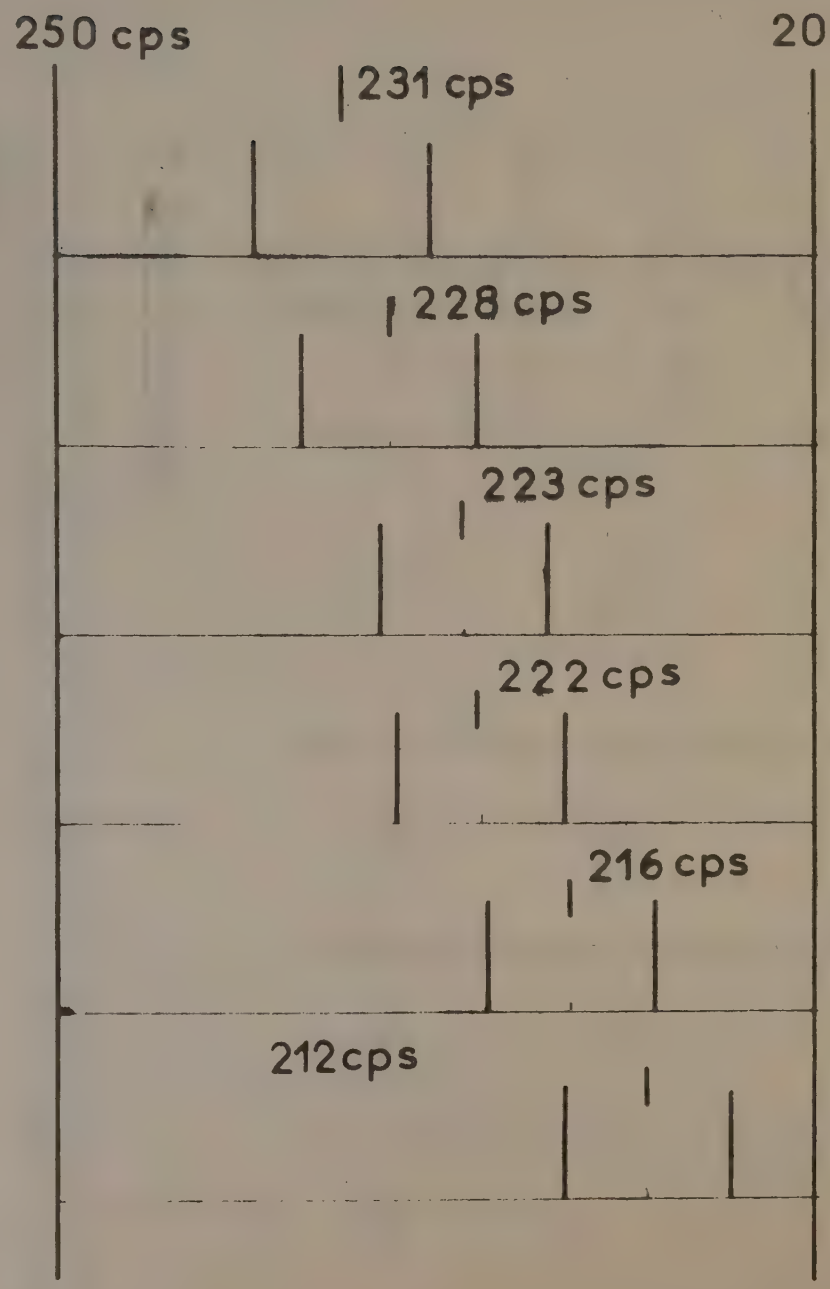
(Tableau XIX voir page 86).

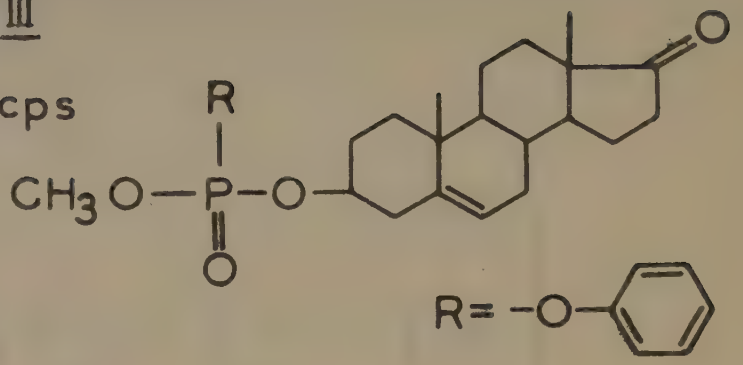
B) Couplage

Les protons des méthoxyles sont couplés avec P^{31}.

Les valeurs données dans le tableau IV montrent que, pour les produits qui y sont discutés, le couplage ne dépend pas ou peu des autres substituants. Pour l'ensemble des composés étudiés ici le couplage observé se situe entre 10,8 et 11,5 cps.

Tableau XVIII





R= —O—

R= —O—$CH_2CH_2C{\equiv}N$

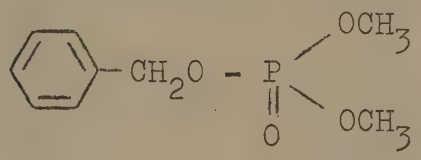
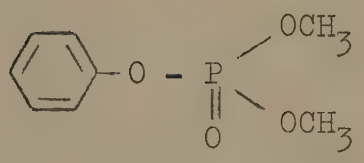
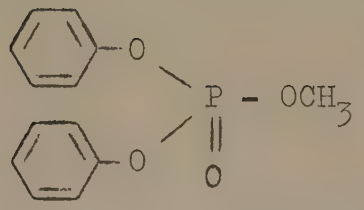
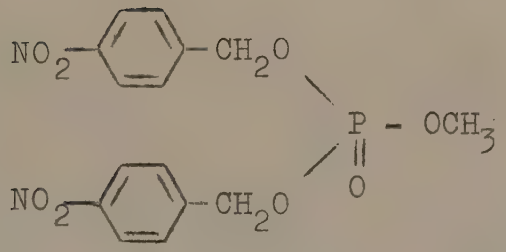
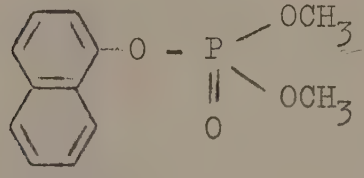
R= —OH, —OCH_3

R= —CH_3, —N O

R= —O^- $\overset{+}{H_2}$N O

R= —O^- $\overset{+}{N}(CH_3)_4$

TABLEAU XIX

	δ	J	n(CH_3O)
	219	11	2,01
	228	11,1	0,97
	237	11,5	0,96
	228,5	11	
	225,5	10,8	2,15

C) Effets stériques

Nous avons constaté dans les spectres des esters méthyliques de méthyl-phosphonates de stéroïdes et de terpènes (Tableau XVII)

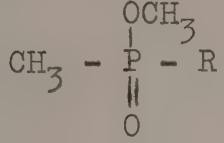


Fig. 13

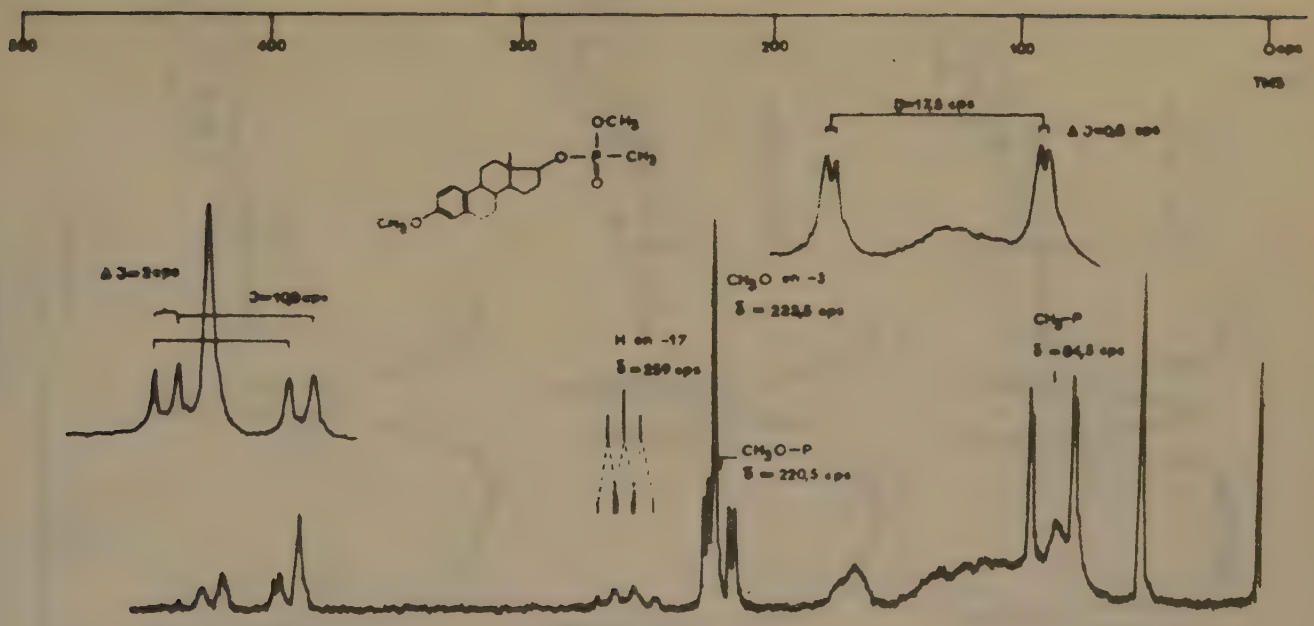

TMS
CH3O on -3
δ = 223,5 cps
H on -17
δ = 259 cps
CH3O—P
δ = 220,5 cps
CH3—P

Fig. 14

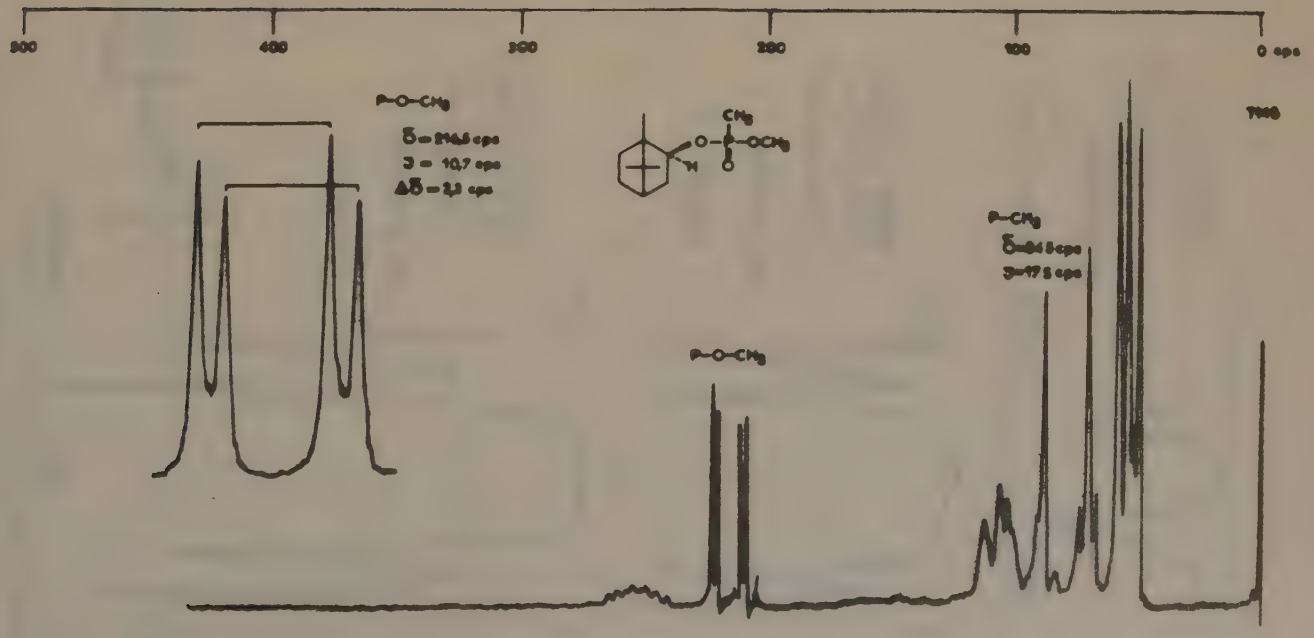

P—O—CH3
δ = 216,5 cps
J = 10,7 cps
Δδ = 2,3 cps
TMS
P—O—CH3
P—CH3

Figure 16

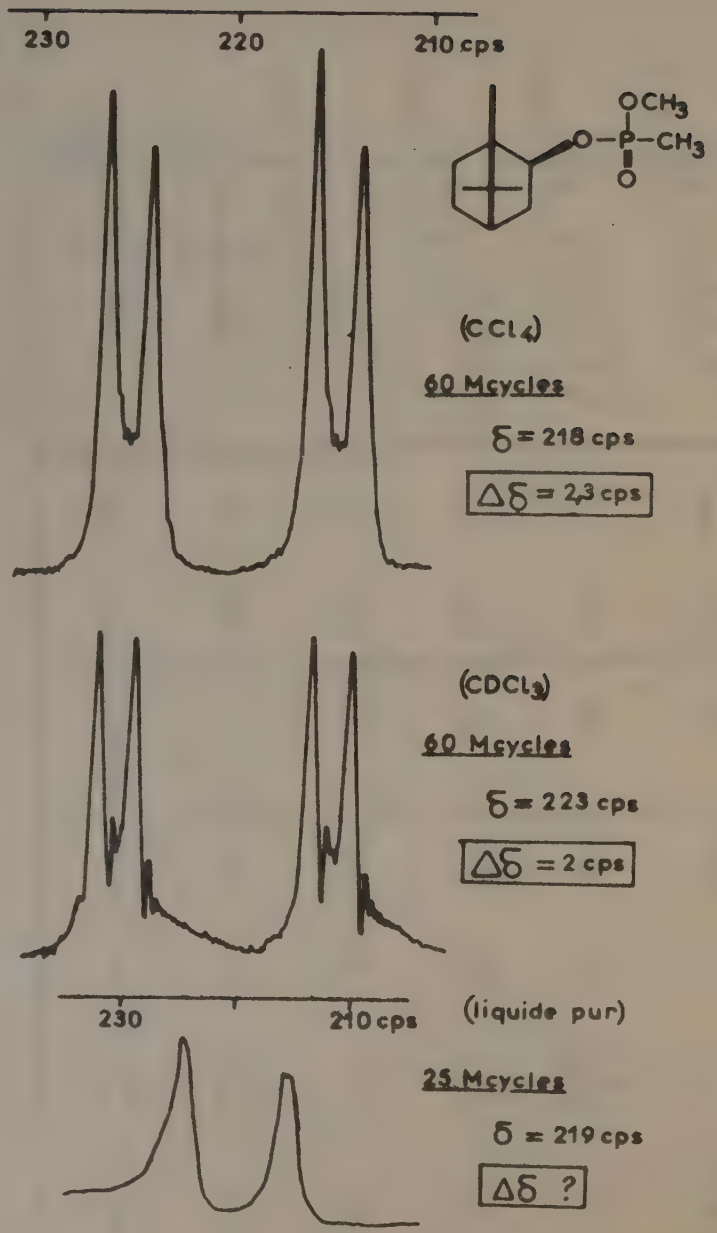


Figure 17

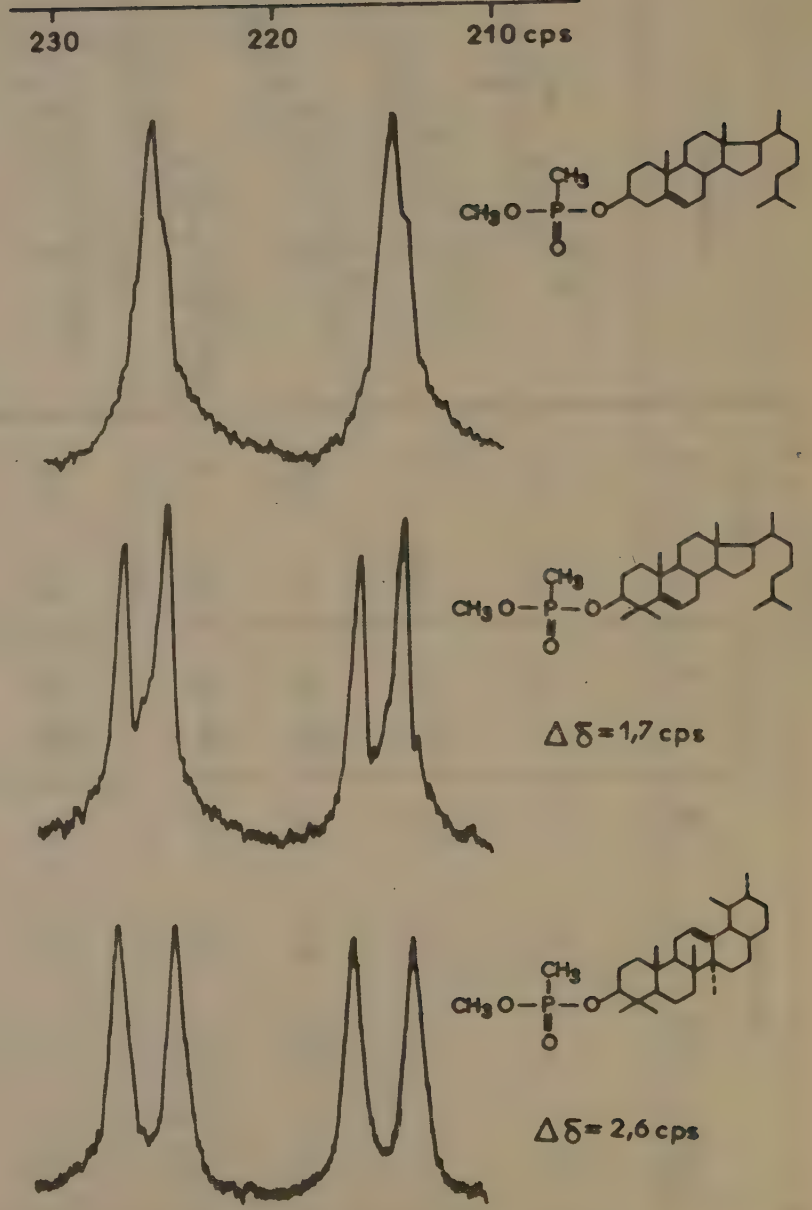
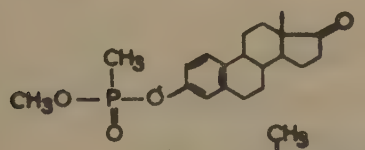
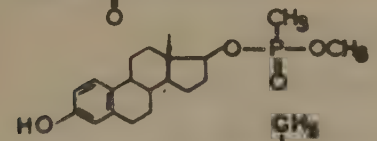
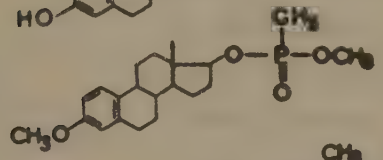
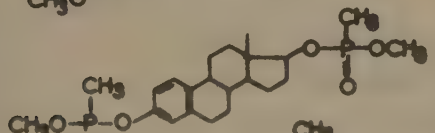
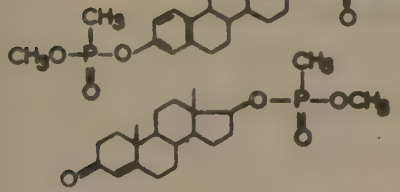
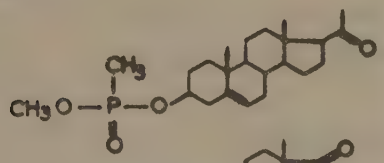
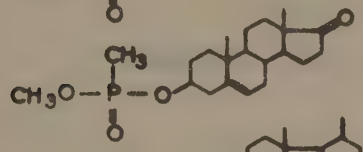
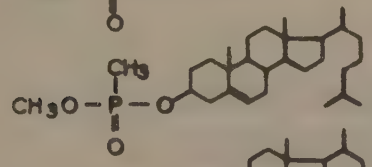
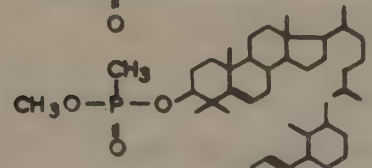
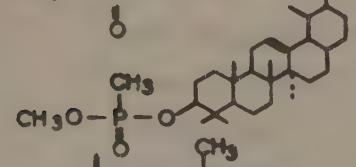
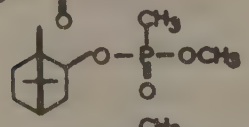
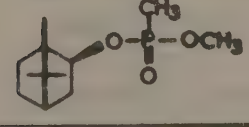


Tableau 17

METHYL-PHOSPHONATE	P–CH₃		P–O–C(sp³)–H	P–O–CH₃			
	δ	J	δ	δ	J	Δδ	n(CH₃O)
	91	17,5	——	228	11	——	1,01
	90	17,5	258	224	11,2	1,8	1,01
	88,5	17,5	258	223	11,2	1,8 (2,3)	0,98
	88	17,2	261	222	10,8	1,8 (2,0)	1,85
	95	17,2	——	227	11	——	
	86,5	17,5	255	222	10,8	1,3	0,98
	87,5	17,5	253	222	11	0	0,96
	85,5	17,5	253	222,5	11	0 (0,6)	0,98
	87	17,5	252	222	11	0 (épaulement)	0,94
	88,5	17,5	238	223	10,8	1,7 (2,0)	0,97
	83	17,5	233	219,5	11	2,6	0,96
	88	17,5		222	11,1	1,0 (1,2)	1,10
	86,5	17,5	258	222,5	11,1	2,0 (2,3)	1,00

un dédoublement secondaire des pics allant jusqu'à 2,6 cps dans les cas où R est asymétrique et encombré. Les différences de déplacement chimique observées sont données dans le tableau XVII.

Nous attribuons cet effet à une rotation gênée due à un encombrement stérique. L'hypothèse d'un couplage est exclue car le dédoublement est fonction du solvant utilisé, les valeurs les plus grandes sont obtenues lorsque les spectres sont mesurés dans le tétrachlorure de carbone (valeurs indiquées entre parenthèses). Le dédoublement est à peine visible sur le spectre du méthyl-phosphonate d'iso-bornyle (Fig. 14) mesuré à 25 mégacycles(*) alors qu'il est de 2,3 cps à 60 mégacycles (Fig. 16). Le dédoublement augmente avec l'encombrement stérique de la molécule au voisinage du groupe méthyl-phosphonyle; par exemple lorsque l'on passe, pour R, du bornéol ($\Delta\delta$ = 1,2 cps) à l'iso-bornéol ($\Delta\delta$ = 2,3 cps) et du cholestérol (épaulement) au 4,4-diméthyl-cholestérol ($\Delta\delta$ = 2,3 cps) et à l'α-amyrine, pour laquelle s'ajoute l'effet buttoir des méthyles en -8 et -10 ($\Delta\delta$ = 2,6 cps) (Fig. 17).

MAVEL a signalé un dédoublement analogue dans le cas du varopal (109).

D) Dédoublement des signaux du méthyle lié au phosphore dans certains méthyl-phosphonates de stéroïdes et de méthyle

Nous avons observé un dédoublement secondaire inattendu des signaux du méthyle directement lié au phosphore dans les spectres des méthyl-phosphonates d'oestradiol et de méthyle, de 3-méthoxy-oestradiol et de méthyle, et du bis-(méthyl-phosphonate de méthyle) d'oestradiol, c'est-à-dire dans tous les cas étudiés de méthyl-phosphonates en -17 sur des stéroïdes ayant un cycle A aromatique. Ce dédoublement est de 0,8 cps lorsque le spectre est

---

(*) Nous remercions le docteur SNATZKE pour un spectre pris à 25 mégacycles sur un appareil Trüb-Taüber KIS 25 sur le liquide pur.

mesuré dans le tétrachlorure (Fig. 13); dans le chloroforme les pics sont élargis mais non dédoublés (Fig. 7). La dépendance de cet effet du solvant utilisé pour la mesure montre qu'il s'agit d'un déplacement chimique et non d'un couplage.

Cet effet n'a, à notre connaissance, jamais été signalé. Nous ne savons pas encore l'interprèter, l'influence du noyau A a aromatique semble probable bien que surprenante vue la distance qui le sépare du groupe méthyle dont les signaux sont dédoublés. L'étude des méthyl-phosphonates d'une série de composés polycycliques, possédant des cycles aromatiques diversement placés, entre autres l'équilénine, aidera sans doute à élucider ce phénomène.

E) Dosage des acides phosphoriques et phosphoniques

L'intégration des signaux dus aux groupes méthoxyles fixés sur le phosphore permet d'évaluer leur nombre et par conséquent le nombre de fonctions acides libres de l'acide phosphorique primitif et de confirmer sa structure.(p. 10).

Cette méthode est surtout utile dans les cas où la nature des substituants rend le dosage acidimétrique impossible du fait, soit d'un manque de solubilité du produit dans l'eau ou le mélange méthylcellosolve/eau, soit de la fragilité en solution ou en milieu alcalin de certains groupes présents dans la molécule. Le groupe méthoxyle convient parfaitement bien pour cette détermination puisque ses signaux apparaissent dans une région peu encombrée du spectre.

Nous avons indiqué dans les tableaux IV, XVII et XIX le nombre de méthoxyles mesuré par ce procédé, l'écart entre cette valeur et la valeur théorique excède rarement 5 %, comme le nombre de groupes méthoxyles ne peut être qu'entier, leur décompte pourra se faire sans ambiguïté. Des écarts plus importants

inciteront à vérifier l'homogénéité du produit examiné.

Nous avons également appliqué cette méthode à quelques pyrophosphates di-estérifiés pour prouver la structure des stéroyl-nucléotides (p. 55).

PARTIE EXPERIMENTALE

Indications générales

Les points de fusion ont été déterminés avec un microscope Reichert à platine chauffante.

Les $[\alpha]_D$ et les dispersions rotatoires ont été mesurés au moyen d'un spectropolarimètre Rudolf 200 à polariseur oscillant.

Les spectres infra-rouges et ultra-violets ont été obtenus respectivement avec les spectrophotomètres Perkin-Elmer 21 et Beckmann DK2.

Les spectres de résonance magnétique nucléaire ont été mesurés à 60 mégacycles sur un appareil Varian A60, avec, comme solvant, le tétrachlorure de carbone, (le deutérochloroforme ($CDCl_3$) ou l'eau lourde (D_2O).

Pour les chromatographies sur papier nous avons utilisé le papier Wattman 3 MM et les solvants suivants :

I isopropanol/$SO_4(NH_4)_2$ aqueux à 1 % (2/I)

II isopropanol/ammoniaque/eau (7/I/2)

Les électrophorèses ont été faites sous 900 Volts dans un tampon phosphate PH 6, avec un appareil construit au laboratoire, le papier (Wattman 3MM) étant refroidi par du monochlorobenzène.

Les dosages électrométriques ont été effectués avec un pH-mètre Zéromatic de chez Beckmann, une électrode de verre modèle 41263 et une électrode de référence au calomel. Les mesures ont été faites à 25°, la solution étant agitée par un courant d'azote avec une solution de soude $\frac{N}{10}$ préparée à l'abri du CO_2 et conservée sous azote.

Les courbes de dichroïsme circulaire ont été mesurées avec le dichrographe Roussel-Jouan sur des solutions dans le dioxane ou le tampon phosphate.

Par "tampon phosphate" nous indiquons le tampon PO_4HNa_2/ PO_4H_2Na préparé selon SÖRENSEN (110).

Nous ne décrivons dans cette partie expérimentale que les modes opératoires définitivement retenus. Les caractéristiques physiques des substances préparées sont rassemblées dans les tableaux insérés dans la partie théorique; nous y renvoyons, seules sont indiquées ici les données qui ne figurent pas déjà dans un de ces tableaux (dhea = déhydroépiandrostérone).

Préparation des esters méthyliques d'acides phosphoriques, phosphoniques et pyrophosphoriques en vue des études spectrales - Mode opératoire général

On dissout, ou on met en suspension, environ 40 mg de l'acide à méthoxyler dans un peu de chloroforme. On refroidit à 0° et on y ajoute une solution froide de diazométhane dans l'éther jusqu'à coloration jaune persistante. La solution est ensuite évaporée, reprise par de l'éther, lavée avec une solution aqueuse de CO_3HNa, séchée sur un peu de SO_4Na_2 et filtrée sur une petite colonne d'environ 1 g de silice. On lave cette colonne à l'éther, le produit obtenu après évaporation de cet éther est séché et son homogénéité contrôlée par chromatographie sur couche mince de silice avant de servir aux mesures spectrales.

Les points de fusion n'ont été indiqués que sur les produits qui ont pu être recristallisés.

Phosphorylation de la déhydroépiandrostérone par l'oxychlorure de phosphore dans la pyridine

Une solution refroidie de 11,52 g (40 mM) de déhydroépian-

drostérone préalablement séché, dans 40 ml de pyridine anhydre est ajoutée goutte à goutte, très lentement, à une solution de 7,2 ml (80 mM) de $POCl_3$ fraîchement distillé dans 40 ml de pyridine refroidie à 0°.

On laisse revenir à la température ordinaire et, après une heure, on verse le mélange réactionnel sur de la glace. On neutralise avec du CO_3HNa et on extrait la solution deux fois avec 50 ml d'éther. Les phases éthérées rassemblées sont lavées avec une solution aqueuse de CO_3HNa. Les solutions aqueuses rassemblées sont acidifiées par HCl 4N; l'acide déhydroépianandrostérone phosphorique précipite , on le lave avec de l'eau acidulée froide, on le filtre et on le recristallise dans le méthanol aqueux.

On obtient 14,2 g d'acide déhydroépiandrostérone-phosphoriq (Rdt. 94 %). Cet acide cristallise avec une molécule d'eau, on peut obtenir l'acide anhydre par chauffage prolongé sous vide à 80°. (Tableau III).

Phosphorylation de la déhydroépiandrostérone par le chlorure de dimorpholyle-phosphoryle

Le réactif a été préparé par addition de la morpholine sur $POCl_3$ et distillé suivant MONTGOMERY et TURNBULL (32).

On fait réagir 380 mg (1,5 mM) de chlorure de dimorpholyle phosphoryle sur 288 mg de déhydroépiandrostérone (1 mM) en solution dans 2 ml de pyridine anhydre, pendant 8 h à 80°. Le produit brut contient 3 produits essentiels, on y ajoute 30 ml d'éther et on lave cette solution avec une solution de CO_3HNa puis à l'eau. La phase éthérée est séchée sur SO_4Na_2, évaporée et le résidu chromatographié sur 5 g d'alumine. On élue successivement 45 mg du produit de départ, 102 mg de phosphodimorpholidate de déhydroépiandrostérone, 17 mg d'un produit non identifié I.R. ($CHCl_3$) 1260 cm^{-1} (P=O) 944 cm^{-1} (P-O-P) ? et 143 mg d'acide

déhydroépiandrostérone morpholino-phosphorique (VIII). Le dimorpholino-phosphate de déhydroépiandrostérone est recristallisé dans l'éther (88 mg, Rdt.: 17 %) (Tableau VII).

2-Cyano-éthyl-phosphate de déhydroépiandrostérone

Une solution de réserve de phosphate de 2-cyano-éthyle dans la pyridine est préparée selon TENER (33) à partir du sel de barium. On dissoud 2 mM de déhydroépiandrostérone dans 5 ml (5 équivalents) de cette solution et on évapore à sec. Le résidu est repris par de la pyridine anhydre et la solution re-évaporée à sec. On répète cette opération 3 fois sans dépasser 40° pour éliminer les dernières traces d'humidité.

On reprend finalement avec 10 ml de pyridine et on ajoute 2 g de DCC. On laisse reposer une nuit à température ordinaire puis on ajoute 4 ml d'acide acétique 2N pour détruire l'excès de DCC. Après 4 h de repos on filtre le précipité de dicyclohexylurée et on le lave avec un peu de pyridine puis à l'eau; la phase aqueuse ainsi obtenue (50 ml) est neutralisée au CO_3HNa puis extraite par 2 fois 50 ml d'éther. Les phases éthérées rassemblées sont lavées par une solution de CO_3HNa et les phases aqueuses rassemblées refroidies, et acidifiées par HCl. Le précipité est filtré et recristallisé dans $MeOH/H_2O$.

655 mg (Rdt: 78 %) F : 133-135°

Analyse : P % Calc. : 7,35

Tr. : 7,45

I.R. : 2260 cm^{-1} très faible (C≡N) 1740 cm^{-1} (C=O)

1235 cm^{-1} (P=O) 1030 cm^{-1} (P-O-C)

R.M.N.: quadruplet à 256 cps (P - O - $\underline{CH_2}$ - CH_2 - CN)

triplet à 167 cps (P - O - CH_2 - $\underline{CH_2}$ - CN)

Hydrolyse du 2-cyano-éthyl-phosphate de déhydroépiandrostérone

On dissout 100 mg de 2-cyano-éthyl-phosphate de déhydroépiandrostérone dans 4 ml de NaOH N et on porte la solution à 100°. L'hydrolyse est complète après 20 min. En acidifiant on précipite 85 mg d'acide déhydroépiandrostérone-phosphorique.

Phosphate de déhydroépiandrostérone et de diméthyle

a) Sans isoler l'acide stéroïde-phosphorique

On ajoute lentement et en agitant une solution de 288 mg de déhydroépiandrostérone et de 0,5 ml de triéthylamine dans 2 ml d'acétone anhydre à 0,2 ml de $POCl_3$ dissous dans 2 ml d'acétone refroidis à 0°. On laisse agiter pendant 1 h puis on ajoute directement 1 ml de méthanol anhydre. Après une heure de repos on filtre le chlorure de triéthylamonium et on ajoute 30 ml d'éther au filtrat. La phase éthérée est lavée par une solution de CO_3HNa et de l'eau, séchée, évaporée. Le résidu est recristallisé dans l'éther. On obtient 260 mg du triester. (Rdt. 66 %). (Tableau IV).

b) En traitant l'acide déhydroépiandrostérone-phosphorique par le diazométhane

On dissout 1,54 g de l'acide dans 20 ml de chlorure de méthylène; une solution éthérée de diazométhane est ajoutée jusqu'à coloration jaune persistante. On laisse reposer 20 min. évapore les solvants et reprend par 100 ml d'éther. La phase éthérée est traitée comme ci-dessus donnant 1,50 g du même produit (Rdt. 94 %).

c) Essai de méthylation de l'acide stéroïde-phosphorique par le sulfate de méthyle

On a traité 1 mM d'acide déhydroépiandrostérone-phosphorique

dissous dans 5 ml d'acétone par 20 ml de NaOH 2N et 0,5 ml de sulfate de méthyle fraîchement distillé, à reflux pendant 16 h. On n'observe aucune réaction dans ces conditions.

Dimorpholinophosphate de déhydroépiandrostérone

On prépare une solution de 572 mg (2 mM) de déhydroépiandrostérone dans 4 ml de dioxane anhydre et 2 ml de triéthylamine et on l'ajoute lentement à une solution de 0,5 ml de $POCl_3$ dans 4 ml de dioxane, refroidie à 0°. Après une heure on ajoute goutte à goutte 2 ml de morpholine au filtrat en refroidissant et en agitant le mélange. La réaction est exothermique, lorsqu'elle est terminée, on ajoute 30 ml d'eau et on extrait cette solution 3 fois avec 30 ml d'éther, on lave la phase éthérée avec une solution de CO_3HNa et à l'eau, on sèche sur SO_4Na_2 et on évapore.

Remarque: si le produit cristallise pendant l'extraction on peut reprendre l'extraction par du chloroforme.

On recristallise dans l'éther et on obtient 880 mg de dimorpholino-phosphate de déhydroépiandrostérone (Rdt.: 87 %) (Tableau VII).

Hydrolyse du dimorpholidate de déhydroépiandrostérone

On dissout 100 mg de dimorpholidate dans 2 ml de dioxane et on ajoute 2 ml d'HCl 2N. On porte à reflux pendant 4 h puis on ajoute un peu d'eau et on laisse refroidir, on filtre et on lave le précipité obtenu; on isole ainsi, après recristallisation 70 mg de phosphate de déhydroépiandrostérone (Rdt.: 90 %).

Chloromorpholinophosphate de déhydroépiandrostérone

On dissout 1,152 g (4 mM) de déhydroépiandrostérone dans 10 ml de dioxane anhydre et on ajoute 1 ml de triéthylamine. On

fait réagir goutte à goutte, en agitant, sur 1 ml de $POCl_3$ dilué par 10 ml de dioxane. Le mélange est maintenu à 0° dans un bain de glace. L'addition se fait en 20 min. environ. Après 1 h on filtre à l'abri de l'humidité le chlorure de triéthylamonium qui a précipité et on lave les cristaux avec un peu de dioxane anhydre.

On ajoute alors 2 ml de morpholine au filtrat refroidi. La réaction est immédiate et légèrement exothermique; le chlorure de morpholinium précipite. Après une heure de repos on ajoute 50 ml d'eau et on extrait avec 3 fois 50 ml d'éther. Si le chloromorpholinophosphate précipite pendant l'extraction on le filtre et le lave avec de l'eau puis de l'éther. La phase éthérée est lavée avec une solution de CO_3HNa et de l'eau puis séchée sur SO_4Na_2 et évaporée.

Le résidu est repris par un mélange CH_2Cl_2/éther (I/2) et filtré sur 5 g de silice. On recristallise dans CH_2Cl_2/éther et on obtient 1,55 g de chloromorpholinophosphate de déhydroépiandrostérone.

(Rdt. : 85 %) (Tableau VII).

Analyse :	C	H	Cl	N	P
Calculé % :	60,59	7,74	7,78	3,07	6,80
Trouvé % :	60,54	7,72	8,18	2,95	6,95

Phosphate de bis-déhydroépiandrostérone et de méthyle

On dissout 576 mg (2 mM) de déhydroépiandrostérone dans 5 ml de pyridine anhydre et on y ajoute goutte à goutte une solution de 0,24 ml d'oxychlorure de phosphore dans 2 ml de dioxane anhydre. On laisse agiter pendant 1 h. Le mélange de chlorure de bis-déhydroépiandrostérone-phosphoryle et de dichlorure de déhydroépiandrostérone-phosphoryle formé est alors refroidi et hydro-

lysé par addition d'un peu d'eau. On évapore les solvants sous vide. Le résidu est repris par 10 ml de chloroforme, la solution obtenue est séchée sur SO_4Na_2 puis traitée par une solution éthérée de diazométhane jusqu'à persistance de la coloration jaune. La solution est alors concentrée à 3 ml et chromatographiée sur 30 g de silice. Un mélange d'acétate d'éthyle et de benzène (30/70) élue successivement la 3-chloro-déhydroépiandrostérone (19 mg, 3 %; F : 154°); le phosphate de bis-déhydroépiandrostérone et de méthyle (170 mg, 28 %); le phosphate de déhydroépiandrostérone et de diméthyle (227 mg, 29 %). Le phosphate de bis-déhydroépiandrostérone et de méthyle est recristallisé dans le méthanol; (Tableau IV).

Bis-déhydroépiandrostérone phosphate de tétraméthylammonium

On ajoute 1 ml de triméthylamine à une solution de 120 mg de phosphate de bis-déhydroépiandrostérone et de méthyle dans 2 ml d'acétone sec. Cette solution est maintenue à 40° pendant 8 jours dans un récipient bien bouché.

On évapore ensuite l'excès de triméthylamine puis on filtre le sel de tétraméthylammonium insoluble dans l'acétone et on le lave avec un peu d'acétone froide. On obtient 98 mg du produit attendu :

$C_{42}H_{66}N\,O_6P$ = 455,56 F : 253-254°

Analyse : P % : Calc. 4,35 Tr. 4,50

R.M.N. : 12 protons à 180 cps. $\left[(CH_3O)_4\,\overset{+}{N}\right]$

(D_2O) pour deux molécules de déhydroépiandrostérone.

Acide bis-déhydroépiandrostérone-phosphorique

On dissout 40 mg du sel de tétraméthylammonium précédant dans 1 ml d'eau et on acidifie la solution avec de l'acide

chlorhydrique dilué. L'acide bis-déhydroépiandrostérone phosphorique précipite; on refroidit la solution, filtre et lave le précipité à l'eau froide.

Recristallisation dans le méthanol (35 mg)

$C_{38}H_{55}O_4$ P = 606,80 F : 228-229°

Analyse : P % Calc. 5,12 Tr. 5,35

I.R. : 1740 cm^{-1} (C=O) 1232 cm^{-1} (P=O)

($CHCl_3$) 1000 - 1030 cm^{-1} massif (P-O-C)

Sel de tétraméthylammonium de l'acide méthyle, déhydroépiandrostérone phosphorique

On dissout 1 g de phosphate de déhydroépiandrostérone et de diméthyle dans 10 ml d'acétone et on y ajoute 1 ml de triméthylamine. Un précipité cristallin commence à apparaître après une heure environ. La réaction est totale après 3 jours à 40°. On laisse évaporer l'excès d'amine. Les cristaux sont filtrés, lavés avec un peu d'acétone froid. Recristallisation dans méthanol/éther donne 1,06 g du sel attendu (Rdt. 92 %).

$C_{24}H_{42}O_5$ PN = 455,56 F : 270° (K)

Analyse : Calc. % P : 6,81 N : 3,07

Tr. P : 6,53 N : 3,13

R.M.N. : 14,2 protons à 207 cps. [$(CH_3O)_4\overset{+}{N}$ et l'un des pics ($CDCl_3$) de CH_3-O-P - dédoublé- l'autre sert à 222,5 cps (1,5 protons) pour 1 molécule de déhydroépiandrostérone.]

I.R. : 1222 cm^{-1} (P=O)

D.C. : (Tampon phosphate pH 7) λ_{max} = 291 mμ $\Delta\varepsilon$ = +3,412 . 10^{-4}

Acide déhydroépiandrostérone, méthyle-phosphorique

En traitant par HCl une solution de 110 mg de déhydroépiandrostérone, méthyle-phosphate de tétraméthylammonium dans 5 ml d'eau on précipite 87 mg d'acide correspondant.

Recristallisation dans le méthanol aqueux.

$C_{20}H_{31}O_5P$ = 383,43 F : 165-166°

Analyse :	Calc. % :	C	62,64	H	8,15	P 8,07
	tr.		62,62		8,10	8,35

I.R. (KBr) 1260 et 1270 cm^{-1} (P O) dédoublé

R.M.N. ($CDCl_3$) doublet à 223 cps (J = 11 cps) de CH_3-O-P, 3 protons

1 proton vers 246 cps (H en -3 du stéroïde).

Dosage (MCS/H_2O) : 1,0 équivalents NaOH.

Acide oestrone-phosphorique

4,055 g d'oestrone (15 mM) sont dissous dans 20 ml de pyridine anhydre et refroidis à -10°. On y ajoute une solution de 4,5 g d'oxychlorure de phosphore dans 20 ml de pyridine également refroidie à -10°.

Le mélange est maintenu à cette température et agité pendant 1 h. Après 1 h on verse le mélange sur de la glace, neutralise par du bicarbonate de sodium et extrait la solution trois fois à l'éther. L'acide oestrone-phosphorique est précipité par addition d'acide chlorhydrique 2N. On filtre et lave le précipité à l'eau acidulée froide, puis à l'éther.

Le produit est recristallisé dans l'éthanol et l'eau (aiguilles).

On obtient ainsi 5,45 g d'acide oestrone-phosphorique monohydraté (Rdt.: 98 %) (Tableau III).

Les autres acides stéroïdes-phosphoriques, décrits dans le Tableau III ont été préparés suivant ce mode opératoire.

L'acide bis-cholestérol-phosphorique a été préparé suivant VENNER (23).

L'acide déhydroépiandrostérone-phényle-phosphorique a été préparé suivant TURNBULL (32).

Les esters méthyliques de ces acides sont décrits dans le tableau VII, ils ont été préparés suivant la méthode générale indiquée p. 91 .

Déhydroépiandrostérone-phosphate de morpholinium (mono).

On ajoute un excès de morpholine (0,2 ml) à une solution de 200 mg d'acide déhydroépiandrostérone-phosphorique puis on évapore à sec. Il se forme le mono-sel de morpholinium que l'on recristallise dans le méthanol et l'acétone (Tableau VII).

Déhydroépiandrostérone, méthyle-phosphate de morpholinium

On ajoute 0,05 ml de morpholine à une solution de 40 mg d'acide déhydroépiandrostérone, méthyle-phosphorique. On évapore la solution et on recristallise le résidu dans l'éther (Tableau VII).

Hydrolyse alcaline du chloro-morpholino-phosphate de déhydroépiandrostérone

100 mg de chloro-morpholino-phosphate sont dissous dans

5 ml de dioxane et agités 24 h avec 1 ml de NaOH 2N, on évapore la majeure partie du dioxane sous vide et on ajoute de l'eau, le produit précipite, on le filtre et on le recristallise dans le méthanol aqueux. On obtient 75 mg d'acide morpholino-phosphorique que nous caractérisons par son sel de morpholinium (Tableau VII) et son ester méthylique (Tableau IV), préparé à de la manière habituelle.

Déhydroépiandrostérone-phosphomorpholidate de morpholinium

On ajoute une goutte de morpholine à 40 mg de l'acide précédent dissous dans un peu de chloroforme, on évapore à sec et on recristallise le résidu dans l'acétone. Ce produit est identique au déhydroépiandrostérone-phosphomorpholidate de morpholinium préparé par substitution d'anion (p. 111) (Tableau VII).

Oestrone-phosphomorpholidate de C-morpholino N,N'-dicyclohexyl carboxamidinium

On dissout 368 mg (I mM) d'acide oestrone-phosphorique monohydraté dans 2 ml de solution 2N aqueuse de morpholine. On y ajoute une solution de 1 g (5 mM) de DCC dans 10 ml de t-butanol. La solution est homogène; on la porte à 80° pendant 6 h.

La réaction est terminée après 2 h. L'examen de la solution par chromatographie sur papier montre alors une tache unique (Rf 0,87).

On laisse refroidir. Après une nuit les cristaux de dicyclo-hexylurée sont filtrés et lavés au t-butanol. Le filtrat et les eaux de lavage sont rassemblés et évaporés sous pression réduite. On reprend le résidu par 30 ml d'eau puis on extrait cette solution à l'éther. La phase aqueuse est séparée et lyophilisée laissant 790 mg de résidu sec.

Ce produit brut, amorphe, est homogène en chromatographie sur papier et électrophorèse par rapport au test de Zimmermann. Il titre 86 % en phosphomorpholidate. Toutes les tentatives de cristallisation sont restées vaines.

U.V. : λ_{max} = 272 mμ, ε = 1.032 ; calculé : 1.220 (85 %)
(MeOH) 277 mμ pour M = 713

D.R. : λ_{max} = 315 mu, $[\alpha]_{max}$ = 1088° ; calculé : 1270 (86 %)
(C = 0,27 , MeOH)

C-morpholino N,N'-dicyclohexylcarboxamidine

On ajoute 1 ml (10 mM) de morpholine à une solution de 1 g (5 mM) de dicyclohexylcarbodiimide dans 10 ml de t-butanol. Le mélange est maintenu à 80° pendant 8 h. Les cristaux de C-morpholino N,N'-dicyclohexylcarboxamidine apparaissent en refroidissant. On les filtre. La concentration des eaux-mères donne un deuxième jet.

Au total 1,180 g (80 %).

Recristallisation dans l'acétate d'éthyle. F: 104-105°.

Analyse: ($C_{17}H_{31}N_3O$ = 293,44)

Calculé :	C	69,58	Trouvé :	C	69,47
	H	10,65		H	10,55
	N	14,32		N	14,31

Reconstitution de l'oestrone-phosphomorpholidate de C-morpholino N,N'-dicyclohexylcarboxamidinium

On dissout 102 mg (0,2 mm) d'oestrone-phosphomorpholidate de morpholinium dans un peu de méthanol et on y ajoute 59 mg (0,2 mm) de C-morpholino N,N'-dicyclohexylcarboxamidine. La solution est évaporée à sec, à froid et le résidu séché sous vide.

Le spectre I.R. de ce produit, en solution dans $CHCl_3$ est identique à celui, fait dans les mêmes conditions, de l'oestrone-phosphomorpholidate décrit plus haut.

Chromatographie sur échangeurs d'ions

Pour la comparaison des méthodes de condensation nous avons séparé les constituants de mélanges réactionnels bruts sur une résine anionique Dowex 2X8, 200 à 400 meshs, mise sous forme $(formiate)^-$.

Une partie des produits bruts, contenant environ 0,05 mM d'adénosine et 0,05 mM d'oestrone sont dissous pour cela dans un minimum d'eau avec un peu de méthanol si nécessaire et portés sur une colonne ayant 10 cm de haut pour 1 cm de section. On lave la colonne à l'eau distillée jusqu'à ce que l'éffluent n'absorbe plus dans l'ultra-violet à 260 mμ. On établit un gradient d'élution en ajoutant à 500 ml d'eau distillée, successivement et en continu, 300 ml d'acide formique N, puis 300 ml d'acide formique 4N, puis de l'acide 8N. L'éluat est recueilli par fractions de 5 ml. La densité optique de chaque fraction à 260 mμ est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre Unicam. Les fractions constituant un pic séparé sont rassemblées, la densité optique totale du corps élué est alors mesurée.

L'homogénéité du pic est ensuite vérifiée par chromatographie sur papier du produit lyophilisé. Les pics principaux apparaissent dans l'ordre suivant :

- acide adénylique
- pyrophosphate P_1, P_2-diadénosine
- pyrophosphate P_1-oestrone, P_2-adénosine.

A.- Condensation en présence de DCC

On sèche 37 mg (0,1 mM) d'acide oestrone-phosphorique monohydraté, par évaporation répétée de leur solution dans du dioxane et du toluène anhydres puis on les mélange à 35 mg (0,1 mM) d'AMP-5 lyophilisé. Le mélange est séché à 60° sous vide sur P_2O_5 durant la nuit, on le dissout en agitant dans 5 ml de diméthylformamide et 0,5 ml de pyridine anhydres. La dissolution est lente mais complète. On ajoute alors 200 mg (1 mM) de dicyclohexylcarbodiimide immédiatement dissous. La solution est agitée et maintenue à 40° durant 3 jours. Les premiers cristaux de dicyclohexylurée apparaissent après une demi-heure environ. La réaction est terminée après 24 h. Après 3 jours on détruit l'excès de DCC en ajoutant 1/2 ml d'acide acétique 2N et 20 ml d'eau. La dicyclohexylurée précipitée est filtrée et lavée avec quelques ml d'eau. Le filtrat et les eaux de lavage sont rassemblés et évaporés à sec sous vide. Une partie aliquote du résidu sec, contenant 0,05 mM d'adénosine est chromatographiée sur échangeurs d'ions comme décrit précédemment.

B.- En présence de trichloracétonitrile

On sèche ensemble 350 mg d'AMP lyophylisés et 365 mg d'acide oestrone-phosphorique préalablement deshydraté par évaporation de leur solution dans le dioxane.

Le mélange est dissout dans 60 ml de diméthylformamide et 4 ml de pyridine anhydres, on ajoute 2 ml de trichloracétonitrile à cette solution et on l'agite pendant 48 h à température ordinaire. La réaction est terminée après 6 h.

Une partie du mélange brut de réaction (3 ml) contenant 0,045 mM d'adénosine, est prélevée, évaporée à sec, reprise par un peu d'eau et analysée par échange d'ion.

C.- En présence de diméthylcyanamide

75 mg d'AMP (0,2 mM) et 75 mg d'acide oestrone-phosphorique (0,2 mM) sont dissous dans 10 ml de diméthylformamide et 1 ml de pyridine anhydres. On ajoute 1 ml de diméthylcyanamide à la solution que l'on maintient ensuite à 80° pendant 16 h. On évapore les solvants sous vide. Le quart du résidu sec, contenant 0,05 mM d'adénosine est porté sur une colonne d'échangeurs d'ions.

La même expérience, utilisant pour solvant 10 ml de diméthylformamide, 5 ml de pyridine et 1 ml d'eau a donné 44 % de pyrophosphate symétrique d'adénosine et 13 % seulement d'acide (P_1-oestrone, P_2-adénosine) pyrophosphorique; 37 % de l'acide adénylique n'ont pas réagi.

D. - En présence d'isocyanate de n-butyle

On dissout 74 mg (0,2 mM) d'acide oestrone-phosphorique et 74 mg (0,2 mM) d'AMP dans de la diméthylformamide et évapore la solution à sec. On répète cette opération deux fois puis on sèche sous vide sur P_2O_5 durant une nuit.

Les produits ainsi séchés sont redissous dans 1 ml de diméthylformamide et 1 ml de pyridine anhydres. On ajoute 1 ml d'isocyanate de n-butyle à cette solution. Après 48 h de repos à température ordinaire on évapore les solvants. Le quart du produit brut de réaction est analysé par échange d'ion.

E.- Condensation par l'intermédiaire d'adénosine-phosphoramidate -5' de dicyclohexylguanidium-1,3

On sèche 33 mg (0,09 mM) d'acide oestrone-phosphorique par évaporation répétée de leur solution dans un mélange de tétrahydrofurane et de toluène. On mélange à 53 mg (0,09 mM)

du phosphoramidate. Le mélange est séché une nuit à 80° sous vide sur P_2O_5. On ajoute alors 0,2 ml de diméthylformamide et 1,8 ml de pyridine anhydres.

La suspension hétérogène obtenue est agitée vigoureusement et maintenue à 40° durant 8 jours. L'examen du mélange par chromatographie sur papier montre que la réaction n'évolue plus après 2 jours. Après 8 jours les solvants sont évaporés sous vide laissant 75 mg de résidu sec. L'examen de ce produit brut montre l'apparition du pyrophosphate dissymétrique comme produit principal, il est accompagné d'AMP et consécutivement de pyrophosphate symétrique di-adénosine, une tache (Rf 0,87) est chromatographiquement identique au pyrophosphate symétrique di-oestrone.

Une partie de ce produit brut (38 mg), contenant 0,045 mM d'adénosine sont dissous dans 10 ml d'eau, neutralisés par quelques gouttes de NaOH diluée et analysés par échange d'ions. Le premier pic élué (AMP-NH_2) ne donne pas de tache unique en chromatographie sur papier après lyophilisation: le phosphoramidate est peu stable et se décompose en milieu acide.

F.- Condensation par l'intermédiaire d'oestrone-phosphomorpholidate de C-morpholino N,N'-dicyclohexylcarboxamidine

On sèche par évaporation de leur solution dans la pyridine: 70 mg (0,2 mM) d'AMP lyophylysés et 170 mg d'oestrone phosphomorpholidate brut (0,2 équivalents). Le mélange est ensuite séché une nuit sous vide sur P_2O_5 puis dissout dans 10 ml de pyridine anhydre et porté à 80°. La solution est claire. Après 24 h les solvants sont évaporés. Le quart du résidu, contenant 0,05 mM d'adénosine est chromatographié.

Cette expérience a été répétée dans les mêmes conditions en utilisant 102 mg (0,2 équivalents) d'oestrone-phosphomorpholidate de morpholinium cristallisé. Les résultats obtenus sont comparables à ceux de la méthode décrite ci-dessus.

G.- Par l'intermédiaire du pyrophosphate P_1-oestrone, P_2-diphényle

On traite 0,2 mM du sel de tri-n-butylammonium de l'acide oestrone-phosphorique par 0,3 mM de chlorure de diphényl-phosphoryle et 0,4 mM de tri-n-butylamine suivant le mode opératoire général indiqué ci-dessous.

Après évaporation des solvants et lavage du résidu à l'éther on ajoute une quantité stoechiométrique (0,2 mM) du sel de tri-n-octylammonium d'AMP en solution dans la pyridine anhydre. On isole en précipitant directement l'acide pyrophosphorique par l'acide chlorhydrique. On obtient 96 mg (70 %) de produit pur.

Préparation de l'acide P_1-oestrone, P_2-adénosine pyrophosphorique par l'intermédiaire du pyrophosphate P_1-oestrone, P_2-diphényle

1) Sel de tri-n-butylamine de l'acide oestrone-phosphorique

3 mM (1,100 g) d'acide oestrone-phosphorique, 1 H_2O sont dissous dans quelques ml de dioxane anhydre.

On ajoute 3 mM (0,720 ml) de tri-n-butylamine. La solution -homogène- est évaporée à sec.

Le résidu est repris 2 fois par du dioxane anhydre et évaporé à sec. Le résidu est ensuite séché pendant 48 h sur P_2O_5 sous vide à température ordinaire.

2) Sel de tri-n-octylammonium de l'AMP 5'

Une solution de réserve est préparée en dissolvant 5 mM (1,839 g) d'AMP et 5 mM (2,30 ml) de tri-n-octylamine dans du méthanol et de la pyridine anhydres. Cette solution est évaporée à sec, le résidu repris 2 fois par de la pyridine et évaporé. On parfait le séchage sous vide sur P_2O_5.

Le résidu est repris, ajusté à 10 ml par de la pyridine anhydre et conservé dans un flacon parafiné.

3) Pyrophosphate P_1-oestrone, P_2-diphényle

Le sel de l'acide oestrone-phosphorique est repris par 5 ml de dioxane anhydre.

On y ajoute 4,5 mM (1,5 équivalents - 0,9 ml) de chlorure de diphényl-phosphoryle puis aussitôt 6 mM (2 équivalents - 1,35 ml) de tri-n-butylamine.

Après une heure de repos à température ordinaire on évapore les solvants sous vide. Le résidu est alors lavé deux fois par 20 ml d'éther anhydre. On reprend par du dioxane et évapore à sec.

4) Pyrophosphate P_1-oestrone, P_2-adénosine

Le résidu précédent est repris par 5 ml de dioxane anhydre. On ajoute 1,2 équivalents (7,2 ml) de la solution de réserve du sel de tri-n-octylammonium d'AMP.

On agite le mélange puis laisse reposer pendant 8 h.

Isolement

L'addition de 25 ml d'éther anydre fait précipiter les sels de tri-n-butylammonium des nucléotides et nucléotidates. On centriguge, les eaux-mères sont décantées. On lave le précipité à plusieurs reprises avec chaque fois 25 ml d'éther anhydre, puis on le sèche.

Le produit brut (3,450 g) est dissout dans un peu de méthanol et d'eau. L'addition d'HCl 2N fait précipiter l'acide pyrophosphorique. On le filtre, le lave à l'eau froide, avec un peu d'acétone, puis à l'éther.

Recristallisation par dissolution dans une solutions diluée de CO_3NaH et précipitation par HCl 2N.

On obtient ainsi 1,880 g (90 %) du pyrophosphate attendu. F : 199 - 199,5°.

Acide P_1-oestrone, P_2adénosine pyrophosphorique par l'intermédiaire du pyrophosphate P_1-adénosine, P_2-diphényle

On opère suivant la méthode générale décrite ci-dessus, mais en traitant le sel de tri-n-octylammonium de l'AMP (0,2 mM) dissout dans du dioxane (1 ml) et un peu de diméthylformamide (0,2 ml) par le chlorure de diphénylphosphoryle (0,3 mM) et la tri-n-butylamine (0,4 mM). On laisse reposer le pyrophosphate P_1-adénosine, P_2-diphényle ainsi obtenu pendant 2 h puis on le lave à l'éther.

On ajoute au résidu, redissout dans du dioxane, 0,1 mM du sel de tri-n-butylammonium de l'acide oestrone-phosphorique dans 0,2 ml de pyridine anhydre.

Le pyrophosphate désiré n'ayant pu être précipité directement, une partie aliquote du résidu sec a été chromatographié suivant la méthode décrite p. 103 . Le rendement est de 76 % par rapport à l'oestrone.

Préparation de stéroyl-nucléotides par réactions d'échange

Méthode générale - Le sel tri-n-butylammonium de l'acide stéroïde-phosphorique , soigneusement séché, est dissout dans très peu de dioxane anhydre (environ 1 mM dans 2 ml).

On ajoute successivement à cette solution 1,5 équivalents de chlorure de diphényle-phosphoryle distillé et 2 équivalents de tri-n-butyl amine. Agiter puis laisser reposer 1 h. On évapore

les solvants sous pression réduite et extrait l'excès de chlorure de diphényle-phosphoryle avec de l'éther anhydre. Le pyrophosphate P_1-stéroïde, P_2-diphényle obtenu n'est pas isolé mais séché par évaporation de sa solution dans le dioxane. Ne pas dépasser 40°.

Le résidu est repris par un peu de dioxane anhydre (2 ml par mM) on y ajoute un léger excès (1,2 à 1,25 équivalents) du sel de tri-n-octylammonium du nucléotide dissous dans un peu de pyridine anhydre.

Après 8 h de repos en précipite les nucléotides et stéroyl-nucléotides à l'état de sels de tri-n-butylammonium par addition d'éther anhydre.

On dissout ces sels dans de l'eau ou un mélange d'eau et de méthanol; l'addition d'HCl 2N fait précipiter le pyrophosphate.

Acide P_1-testostérone, P_2-adénosine pyrophosphorique

On prépare le pyrophosphate P_1-testostérone, P_2-diphényle suivant la méthode générale, à partir de 3 mM (1160 g) d'acide testostérone-phosphorique et on le traite par un léger excès (1,2 équivalents) de la solution de réserve de AMP,$NOct_3$ dans la pyridine. On précipite 2,200 g de sels de tri-n-butylammonium par l'éther. L'addition d'acide chlorhydrique dilué précipite 1,77 g (84 %) de l'acide pyrophosphorique attendu (Tableau XVI).

Acide P_1-oestradiol, P_2-adénosine pyrophosphorique.

Traitée de la même manière 1 mM d'acide oestradiol-3-phosphorique donne 295 mg (84 %) de pyrophosphate.

Acide P_1-déhydroépiandrostérone, P_2-adénosine pyrophosphorique

2 mM d'acide déhydroépiandrostérone-phosphorique donnent 1,820 g de sels de tri-n-butylammonium à partir desquels on précipite 1,060 g d'acide libre (74 %).

Acide P_1-prédnisolone, P_2-adénosine pyrophosphorique

mM d'acide prednisolone-21-phosphorique donnent 1,9 g de sels de tri-n-butylammonium puis 1,1 g de pyrophosphate(70%).

Acide P_1-hydrocortisone, P_2-adénosine pyrophosphorique

2,4 mM d'acide hydrocortisone-21-phosphorique donnent 2,215 g de sels de tri-n-butylammonium puis 0,900 g d'acide libre (47 %).

Acide P_1-dexaméthasone, P_2-adénosine pyrophosphorique

2,5 mM d'acide dexaméthasone-phosphorique donnent 2,150 g de sels de tri-n-butylammonium puis 1,3 g de pyrophosphate (65 %).

Oestrone-phosphomorpholidate de morpholinium

3 mM de pyrophosphate P_1-oestrone, P_2-diphényle sont préparés suivant la méthode générale et repris par 5 ml de dioxane anhydre. On y ajoute 5 ml d'une solution à volumes égaux de morpholine et de pyridine. Après 8 h de repos à température ordinaire les solvants sont évaporés, le résidu lavé à l'éther puis redissous dans de l'acétone.

Les cristaux de phosphomorpholidate précipitent lorsque l'on refroidit, on les filtre et les lave à l'éther. Le produit brut ainsi obtenu contient une forte proportion de diphénylphosphate de morpholinium (env. 30 %) aisément séparé par recristallisation dans le méthanol et l'acétone.

On obtient 1,415 g (94 %) de phosphomorpholidate de morpholinium.

$C_{26}H_{39}N_2O_6P$ = 506,58 F : mal défini aux environs de 170°

Analyse : calculé	C	61,77	trouvé :	C 61,72
	H	7,76		H 7,72
	P	6,12		P 6,17

U.V. λ_{max} = 272 mμ (ε_{max} = 1110)

(MeOH) 277 mμ (ε_{max} = 1060)

D.R. λ_{max} = 315 mμ $[\alpha]$ = 1820° (c=0,28 ; MeOH)

(calculé : oestrone = 1790°)

D.C. (Tampon pH 7) λ_{max} = 292 mμ $\Delta\varepsilon$ = +4,14

R.M.N. et I.R. : Tableau VII.

Déhydroépiandrostérone phosphomorpholidate et morpholinium

Le même mode opératoire donne, à partir de 1 mM d'acide déhydroépiandrostérone-phosphorique, 350 mg (67 %) de phosphomorpholidate recristallisé dans l'acétone. (Tableau VII).

Acide P_1,P_2-dioestérone pyrophosphorique

On prépare le pyrophosphate P_1-oestrone, P_2-diphényle suivant la méthode générale. On dissout 1 mM de ce dernier dans 2 ml de dioxane sec et on y ajoute 1/2 ml d'une solution de réserve contenant 1 mM d'eau par ml de pyridine. On laisse reposer la nuit. Les solvants sont ensuite évaporés, le résidu repris par du méthanol. On ajoute alors 2,5 ml d'une solution normale de Br_2Ba dans le méthanol, les sels de barium de l'acide dioestrone pyrophosphorique précipitent, on les sépare, l'addition d'éther aux eaux-mères fait précipiter un deuxième jet. Les précipités réunis sont lavés à l'éther, centrifugés et remis en suspension dans le méthanol. L'addition d'acide sulfurique dilué fait précipiter le sulfate de baryum que l'on filtre. Le filtrat est évaporé à sec, l'addition d'acétate d'éthyle fait cristalliser le produit. La recristallisation dans MeOH/AcOEt donne 310 mg (87 %) du pyrophosphate attendu.

$C_{35}H_{45}O_9P_2$, 1 H_2O = 700,68

Analyse :		C	H	P
	Calc. %	59,99	6,77	8,84
	Tr.	59,97	6,80	8,44

U.V. (MeOH) Calc. λ_{max} = 270 mμ ε_{max} = 2400
Tr. λ_{max} = 270 mμ ε_{max} = 2380

D.R. : λ_{max} = 312,5 mμ $[\alpha]_{max}$ = 2450° (Calculé 2430°)

I.R. (KBr) : 1240 cm^{-1} (P = O)

CONCLUSION

Nous décrivons dans ce travail plus de 60 dérivés phosphorés d'hormones appartenant pour la plupart à des séries nouvelles; phosphomorpholidates, chloro-morpholino-phosphates, méthyl-phosphonates, pyrophosphates symmétriques de stéroïdes et stéroyl-nucléotides sont décrits ici pour la première fois.

La plupart des méthodes de phosphorylation et de condensation d'esters phosphoriques utilisées étaient connues, nous les avons adaptées, puis comparées pour choisir celles qui convenaient le mieux à ce domaine particulier de substances. La préparation des stéroyl-nucléotides en particulier a nécessité une discussion comparative des principales méthodes de condensation. Les voies d'accès aux phosphates de stéroïdes ont été améliorées et complétées. Une nouvelle préparation des morpholino-phosphates et des chloro-morpholino-phosphates est proposée; un nouveau procédé de condensation, utilisant les chloro-morpholino-phosphates, pour la synthèse d'esters pyrophosphoriques dissymétriques est ébauché.

Nous avons mis au point pour chaque catégorie de substances un mode opératoire permettant d'obtenir des quantités suffisantes de produits pour permettre des essais d'activité biologique.

Le second but de cette thèse était l'exploration des méthodes physiques, spectrales et chromatographiques, qui permettraient l'identification, le contrôle et la caractérisation de ces produits et l'analyse de leurs mélanges.

Les résultats obtenus dans cette recherche peuvent être rangés sous deux rubriques suivant qu'ils concernent les produits

eux mêmes ou leurs dérivés méthoxylés s'il s'agit d'acides.

La possession d'un nombre suffisant de substances dans des séries identiques, méthyl-phosphonates et phospho-morpholidates nous a permis de reconnaître et de discuter l'attribution des bandes d'absorption de ces substances dans l'infra-rouge.

Les spectres dans l'ultra-violet des stéroyl-nucléotides donnent un nouvel exemple de l'hypochromie observée lorsqu'une molécule d'un nucléotide est condensée avec une autre molécule.

Le dichroïsme circulaire fournit une donnée caractéristique de la partie stéroïdique des stéroyl-nucléotides.

La résonance magnétique nucléaire des protons permet de reconnaître les méthyles directement liés au phosphore; elle permet aussi de distinguer les groupes morpholino portés par le phosphore des groupes morpholinium dans les sels d'acides phosphoriques,et de les dénombrer. Le spectre R.M.N. du méthyl-phosphonate de bornyle nous a donné l'occasion d'analyser un couplage de protons à longue distance malgré un couplage supplémentaire avec le phosphore.

La plupart des acides stéroïde-phosphoriques et stéroïde-méthyl-phosphoniques ont pu être dosés en solution dans un mélange de méthylcellosolve et d'eau.

La préparation et l'étude des esters méthyliques des dérivés phosphorés acides se sont révélées fructueuses. La préparation des esters méthyliques est aisée, elle permet d'étendre la chromatographie sur couche mince de silice aux acides phosphoriques traités, directement sur la plaque, par du diazométhane d'où une méthode rapide d'analyse et d'identification des constituants des mélanges réactionnels.

De même le passage par l'intermédiaire des esters méthyliques rend possible la séparation préparative, sur colonne de silice, des acides correspondants; ce procédé sera utilisable chaque fois qu'il suffira d'ôter un seul groupe méthyle, ce qui est facile, sur le phosphore pour retrouver l'acide original.

Les spectres infra-rouge et de R.M.N. des esters méthyliques complèteront utilement la caractérisation des acides correspondants.

Nous montrons aussi que l'intégration des pics en R.M.N. permet une bonne estimation du nombre de groupes méthoxyles et, partant de là, du nombre d'hydroxyles acides estérifiés.

L'étude des spectres de R.M.N. des méthyl-phosphonates de stéroïdes et de méthyle, ou de terpènes et de méthyle, nous a permis de décrire deux phénomènes de déplacements chimiques secondaires nouveaux, dont l'un a pu être attribué à une rotation gênée due à un encombrement stérique.

L'ensemble de ce travail fournit matière à des recherches ultérieures.

APPENDICE

ACTIVITES PHYSIOLOGIQUES, BIOLOGIQUES ET PHARMACODYNAMIQUES

Un certain nombre des dérivés phosphorés d'hormones que nous avons préparés ont été testés en vue de reconnaître leur éventuelle activité physiologique ou pharmacologique. Ces essais ont été effectués sous la direction des Professeurs VIVIEN et MANDEL à Strasbourg et du Docteur JACOB à l'Institut Pasteur (Paris).

De nombreux travaux expérimentaux ont apporté la preuve que les hormones naturelles et synthétiques, appartenant au groupe des stérols exercent une action sur la différenciation des caractères sexuels primaires et secondaires des vertébrés.

Dès 1935, DANTCHAKOFF, WOLFF et GINGLINGER, WOLFF (111) avaient montré que l'embryon d'oiseau réagit à ces hormones et constitue un excellent test de leur activité morphogène. Très rapidement la conviction était acquise que, non seulement des substances différentes exercent des activités de degré divers sur le tractus génital, mais que les dérivés d'un même noyau commun varient considérablement en fonction de la nature et de la position des radicaux et des chaînes plus ou moins complexes greffées sur le noyau principal de substances telles que l'oestrone, l'androstérone ou la testostérone.

Des essais ont été faits, sur l'embryon de poulet, dans le laboratoire du Professeur VIVIEN (112) avec les substances suivantes :

- acide oestrone-phosphorique (113)
- pyrophosphate P_1-oestrone, P_2-adénosine
- oestrone-phosphomopholidate de morpholinium

- acide testostérone-phosphorique
- chloromorpholino-phosphate de déhydroépiandrostérone
- dimorpholino-phosphate de déhydroépiandrostérone.

Globalement l'activité des dérivés de l'oestrone est conforme à celle enregistrée après traitement par l'oestrone pure ou par le benzoate d'oestradiol. Ces dérivés provoquent chez l'embryon mâle traité avant le 6e jour de l'incubation, la féminisation de la gonade gauche et le maintien des canaux de Müller.

Toutefois le seuil d'activité est plus faible, aux environs de 1γ pour l'acide oestrone-phosphorique, de 2γ pour les deux autres dérivés oestrogènes. Les transformations les plus fortes dans le sens d'une féminisation sont enregistrées pour des doses respectives de 10γ et 20γ par embryon.

Il est à remarquer que ces trois produits agissent sur la gonade droite de l'embryon de poulet aussi bien mâle que femelle en provoquant le maintien d'un cortex fertile, ce qui témoigne de la précosité et de l'intensité de leur action.

Pour les dérivés de la testostérone et de la déhydro-épiandrostérone l'action masculinisante se situe à des seuils beaucoup plus élevés, de l'ordre de 100 à 150γ. Il semble cependant que dès la dose de 50γ le chloromorpholino-phosphate de déhydro-épiandrostérone exerce une neutralisation de l'activité testiculaire des embryons mâles entraînant des perturbations dans la régression des canaux de Müller.

Les essais effectués par le Professeur MANDEL (115) sont orientés vers la recherche du mode d'action de ces produits à l'échelle moléculaire et sont dirigés par d'autres considérations.

Ainsi par exemple: les oestrogènes produisent une activation des synthèses d'acides ribonucléiques et des phospho-protéines

dans le foie des oiseaux mais cet effet n'a pas pu être reproduit in-vitro quand des coupes de foie sont incubées en présence (114) d'oestrogènes. Etant donné que les nucléotides d'un certain nombre de composés se sont avérés être leur forme active il devenait particulièrement intéressant de procéder à des essais métaboliques sur des coupes de foie de poulet en les incubant avec de l'oestrone-diphosphate-adénosine; on a suivi, d'une part la consommation d'oxygène et d'autre part l'incorporation de P^{32} dans les acides ribonucléiques; aucun effet significatif n'a pu être décelé. Ceci n'exclut pas la possibilité, pour le stéroyl-nucléotide d'exercer un effet, la perméabilité des cellules à l'oestrone-diphosphate-adénosine peut en effet être mise en cause et reste à vérifier.

L'oestrone-phosphomorpholidate de morpholinium a été essayé, étant donné ses propriétés de solubilité, en injection intra-cisternale dans le but d'explorer un effet éventuel sur le métabolisme de l'hypothalamus à l'échelle moléculaire. L'analyse de la répartition des nucléotides qui interviennent dans le métabolisme des lipides, glucides et protides, paraissait pouvoir servir de test dans les essais pilotes. Des modifications avaient été observées par l'implantation de cristaux d'oestradiol dans la région hypothalamique; les essais effectués sur le rat avec l'oestrone phospho-morpholidate n'ont pas été concluants mais les possibilités d'administration par voie rachidienne chez le rat sont évidemment limitées (30-50 µl).

Il serait utile, avant de continuer les essais, de vérifier la pénétration et la distribution de ces produits dans les tissus ou organes étudiés, à l'aide d'oestrone marqué.

Les essais pharmacologiques ont été effectués par N.V. ORGANON (Oss): L'acide oestrone-phosphorique ne montre pas d'effet oestrogène sur le rat. L'oestrone-phosphomorpholidate de morpholinium possède un faible effet vasodilatateur sur les artères coronaires chez le cobaye et un effet cardiotonique sur le coeur de grenouille. L'oestrone-diphosphate-adénosine et le testostérone-diphosphate-adénosine sont des vasodilatateurs actifs sur les artères coronaires mais moins cependant que l'ATP. L'oestrone-diphosphate-adénosine a également un effet cardiotonique sur le coeur de grenouille. Les essais se poursuivent.

Les propriétés physiologiques des méthyl-phosphonates de Stéroïdes sont actuellement étudiées par le Docteur JACOB (Paris). Ces produits sont peu toxiques, mais aussi peu actifs sur la souris; les méthyl-phosphonates de testostérone et de déhydroépiandrostérone sont les plus toxiques (sédation, stimulation).

BIBLIOGRAPHIE

1) CIBA Foundation, Biosynthesis of Terpenes and Steroids, Churchhill (London 1959)

2) A.J. BIRCH, Proc. Chem. Soc. 1962, 3

3) P. OESPER, Phosphorus Metabolism , The John Hopkins Press (Baltimore, 1951)

4) T. REICHSTEIN et W. SCHWINDLER, Helv. Chim. Acta 23, 669 (1940).

5) E. MULLER, A. LANGERBECK et W. RIEDEL, Hoppe Seyler's Z. 281, 29 (1944)

6) CIBA, Brevet Brit. 578.551 (1946) (Chem. Abstr. 1947, 2450

7) CIBA, Brevet Suisse 236.223 (1945); (Chem. Abstr. 1949, 7056)

8) A.R. TODD et F.R. ATHERTON, Brevet Brit. 674.087 (1952); (Chem. Abstr. 1953, 6436)

9) W.J. GENSLER et A.P. MAHADEVAN, J. amer. Chem. Soc. 76,6192(1954)

10) O. FERNÖ, U. FEX, B. HÖGBERG, T. LINDEROT, S. VEIGE, et E. DICZFALUSY, Acta chem. Scand. 12, 1675 (1958)

11) G.I. POOS, R.HIRSCHMANN, G.A. BAILEY, F.A. CUTLER, L.U. SARETT et J.M. CHEMERLA, Chem. and Ind. 1958, 1260

12) G.W. OERTEL et V. GROESCHEL, Biochem. Z. 330, 452 (1958)

13) G.W. OERTEL, Naturwissenschaften 49, 392 (1962)

14) A. CRASTES DE PAULET, H. FLOCH et E.E. BAULIEU, Bull. Soc. Chim. Biol. 44, 843 (1962)

15) J. RIESS et G. OURISSON, Bull. Soc. Chim. 1961, 1243
N.V. ORGANON, Brevet Neerlandais 266.276 (1961)

16) G.W. OERTEL et K.B. EIK-NES, Acta Endocrinologica 30, 93 (1959)

17) F. CRAMER, Angew. Chem. 72, 236 (1960)

18) A.M. MICHELSON, Arch. Bioch. Polonica 1959, 336

19) V.M. CLARK, G.W. KIRBY et A.R. TODD, J. Chem. Soc. 1957, 1497

20) R.W. CHAMBERS et H.G. KHORANA, J. amer. Chem. Soc. 80,3749(1958)

21) H. v.EULER et A. BERNTON, Ber. 60, 1720 (1927); 62, 2451 (1929)

22) R.H.A. PLIMMER et W.J.N. BURCH, J. Chem. Soc. 1929, 279

23) H. VENNER, Z. für praktische Chemie 4, (12), 59 (1960)

24) T. WAGNER-JAUREGG, L. LENNARTZ et H. KOTHNY, Ber. 74,1513 (1941)

25) H.A.C. MONTGOMERY, J.H. TURNBULL et W. WILSON, J. Chem. Soc. 1956, 4603

26) O.M. FRIEDMAN et A.M. SELIGMAN, J. amer. Chem. Soc.73,5292(1951)
D.A. BROWN, T. MALKIN et G.K. MALIPHANT, J. Chem. Soc. 1955,1585

27) T. WAGNER-JAUREGG, Ber. 77, 481 (1944)

28) I.R. HUNTER, R.L. ROBERTS et E.B. KESTER, J. amer. Chem.Soc. 70, 3244 (1948)
W.G. ROSE, J. amer. Chem. Soc. 69, 1384 (1947)

29) F. ZETZSCHE et W. BÜTTIKER, Ber. 73, 47 (1940)

30) K. ZEILE et W. KRUCKENBERG, Ber. 75, 1127 (1942)

31) J.H. TURNBULL et W. WILSON, J. chem. Soc. 1954, 2301

32) H.A.C. MONTGOMERY et J.H. TURNBULL, J. chem. Soc. 1958, 1963

33) P.T. GILHAM et G.M. TENER, Chem. and Ind. 1959, 542
G.M. TENER, J. amer. Chem. Soc. 83, 159 (1961)

34) E. CHERBULIEZ, H. DAHN, H. HOLL, H. PROBST et J. RABINOWITZ, Helv. Chim. Acta 45, 1075 (1962)

35) A. LAPIDOT, D. SAMUEL et B. SILVER, Chem. and Ind. 1963, 468

36) J.A. MONTGOMERY et H.J. THOMAS, J. Org. Chem. 26, 1926 (1961)
G. SHAW et D.V. WILSON, Proc. Chem. Soc. 1961, 381
J. ŽEMLIČKA, J. SMRT et F. ŠORM, Coll. czedr. chem. Comm. 27, 1462 (1962)
H. WITZEL, H. MIRBACH et K. DIMROTH, Angew. Chem. 72,751 (1960)

37) J.L. BELLAMY, The Infra-red Spectra of Complex Molecules, Methuen & Co (London 1958)

38) L.J. BELLAMY et L. BEECHER, J. Chem. Soc. 1952, 1701; 1953, 729

39) A.R. TODD, Proc. Chem. Soc. 1962, 199

40) V.M. CLARK, D.W. HUTCHINSON, G.W. KIRBY et A.R. TODD, J. chem. Soc. 1961, 715

41) H. GRUNTZE, Z. anorg. und allgem. Chemie 298, 152 (1959)

42) H. GRUNTZE, Angew. Chemie 71, 407 (1959)

43) W. SIMON, Helv. Chim. Acta 41, 1835 (1961)

44) F.S. WALLIS et E. FERNHOLTZ, J. amer. Chem. Soc. 59, 764 (1937)

45) D.H. HAYES, A.M. MICHELSON et A.R. TODD, J. chem. Soc. 1955,808

46) P. CHABRIER et M. SELIM, C.R. Acad. Sci., 244, 2730 (1957)

47) J. CHEYMOL, P. CHABRIER, M. SELIM et P LEDUC, C.R. Acad. Sci. 247, 1014 (1958)

48) J. CHEYMOL, P. CHABRIER, M. SELIM et P. LEDUC, C. R. Acad. Sci. 249, 2573 (I959)

49) L. DORFMAN, Chem. Rev. 53, 47 (1953)

50) E.M. POPOV, M.I. KABATCHNIK et L.S. MAINTZ, Usp. Khim. SSSR 30, 846 (1961)

51) T.L. HILL et M.F. MORALES, J. Amer. Chem. Soc. 73, 1656 (1951)

52) R.W. CHAMBERS et H.G. KHORANA, Chem. and Ind. 1956, 1022

53) R.W. CHAMBERS et J.G. MOFFAT, J. amer. Chem. Soc. 80, 3752(1958)

54) S. ROSEMAN, J.J. DISTLER, J.G. MOFFAT, H.G. KHORANA, J. amer. Chem. Soc. 83, 659 (1961)

55) J.G. MOFFAT et H.G. KHORANA, J. amer. Chem. Soc. 83, 649 (1961)

56) V.M. CLARK, G.W. KIRBY et A.R. TODD, J. chem. Soc. 1957, 1497

57) L.W. DAASCH et D.C. SMITH, Analyt. Chem. 23, 853 (1951)

58) J.V. BELL, J. HEISLER, H. TANNENBAUM et J. GOLDENSON, J. amer. chem. Soc. 76, 5186 (1954)

59) H.K. HALL, J. amer. chem. Soc. 79, 5441(1957)

60) G. MAVEL et G. MARTIN, J. de Chim. Phys. 1962, 762.

61) J. RIESS, Travaux non publiés

62) G. MARTIN et G. MAVEL, C.R. Acad. Sci. 253, 644 (1961)

63) J. MEINWALD et A. LEWIS, J. amer. chem. Soc. 83, 2769 (1961)
K.B. WIBERG, B.R. LOWRY et B.J. NIST, J. amer. chem.Soc. 84, 1594 (1962)
J.I. MUSHER, Molecular Physics 6, 93 (1963)

64) E. GRYSZKIEWICZ-TROCHIMOVSKY, J. QUINCHON et M. BOUSQUET, Bull. Soc. Chim. 1962, 1645

65) J. QUINCHON, M. le SECH et E. GRYSZKIEWICZ-TROCHIMOVSKY, Bull. Soc. Chim. 1962, 169

66) J.A.A. KETELAAR et H.R. GERSMANN, Rec. Trav. Chim. Pays-Bas 78, 190 (1959)

67) J.G. MOFFAT et H.G. KHORANA, J. amer. chem. Soc. 80, 3756 (1958)

68) DAVIDSON et SMELLIE, Biochem. J. 52, 594 (1952)

69) A.M. MICHELSON, Nature 182, 1502 (1958)

70) J. BADDILEY et A.R. TODD, J. chem. Soc. 1947, 648

71) J. BADDILEY, A.M. MICHELSON et A.R. TODD, J. chem. Soc. 1949,582

72) G.W. KENNER , C.B. REESE et A.R. TODD, J. chem. Soc. 1958, 547

73) F.R. ATHERTON, A.L. MORRISON, R.J.W. CREMLYN, G.W. KENNER, A.R. TODD et R.F. WEBB, Chem. and Ind. 1955, 1183

74) G.W. KENNER, A.R. TODD et R.F. WEBB, J. chem. Soc.1956, 1231

75) B.H. CHASE, G.V. KENNER, A.R. TODD et R.F. WEBB, J. chem. Soc. 1956, 1371

76) F. CRAMER et W. WINTER, Chem. Ber. 92, 2761 (1959)

77) H.A. STAAB, H. SCHAEFER et F. CRAMER, Angew. Chem.71,736 (1959)

78) F. CRAMER et R. WITTMANN, Chem. Ber. 94, 322 (1961)

79) N.S. CORBY, G.W. KENNER et A.R. TODD, J. chem. Soc. 1952, 1234

80) S.M.H. CHRISTIE, D.T. ELMORE, G.W. KENNER, A.R. TODD et F.J. WEYMOUTH, J. chem. Soc. 1953, 2947

81) A.R. TODD, Proc. chem. Soc. 1962, 199

82) G. WEIMANN et H.G. KHORANA, J. amer. Chem. Soc.84, 4329 (1962)

83) V.M. CLARK, D.W. HUTCHINSON, G.W. KIRBY et A.R. TODD, J. chem. Soc. 1961, 715, 722
M. VILKAS et E. LEDERER, Experientia 18, 546 (1962)

84) A.M. MICHELSON, Communication privée

85) F. ZETSCHE et G. BAUM, Ber. 75B, 100 (1942)

86) H.G. KHORANA et A.R. TODD, J. chem. Soc. 1953, 2257

87) H.G. KHORANA, Canad. J. Chem. 32, 227 (1954)

88) H.G. KHORANA, Chem. Rev. 53, 145 (1953)

89) Références de M. SMITH, J.G. MOFFAT et H.G. KHORANA, J. amer. chem. Soc. 80, 6204 (1958)

90) N.A. HUGHES, G.W. KENNER et A.R. TODD, J. chem. Soc. 1957,3733

91) F.N. STEPANON et N.J. SHIROKOVA, J. gen. Chem. (U.R.S.S.) 25, 905 (1955); (Chem. Abstr. 50, 3209 (1956))

92) F.D. CRAMER et G. WEIMANN, Chem. and Ind. 1960, 46

93) F. CRAMER et W. BÖHM, Angew. Chem. 71, 775 (1959)

94) K. LOHMANN, Biochem. Z. 271, 264 (1934)

95) J.G. MOFFAT et H.G. KHORANA, J. amer. chem. Soc. 83, 663 (1961)

96) F. LYNEN, Angew. Chem. 70, 738 (1958)

97) H. EGGERER, Chem. Ber. 94, 175 (1961)

98) O.MEYERHOFF et K. LOHMANN, Biochem. Z. 196, 22 (1928)

99) S.M. CHRISTIE, G.W. KENNER et A.R. TODD, J. chem. Soc. 1954, 46

100) A.M. MICHELSON et A.R. TODD, J. Chem. Soc. 1956, 3459

101) H.S. MASON et A.R. TODD, J. chem. Soc. 1951, 2267

102) F.R. ATHERTON et A.R. TODD, J. chem. Soc. 1947, 674

103) A. HAMPTON et M.H. MAGUIRE, J. Amer. chem. Soc. 83, 151 (1961).

104) R.W. CHAMBERS, J.G. MOFFAT et H.G. KHORANA, J. Amer. chem. Soc. 77, 3416 (1955)

105) N.S. CORBY, G.W. KENNER et A.R. TODD, J. Chem. Soc. 1952, 3669

106) B.E. GRIFFIN et A.R. TODD, J. chem. Société 1958, 1389

107) A.M. MICHELSON, Chem. and Ind. 1960, 1267

108) C. MORIN, Bull. soc. Chim. 1961,1446

109) G. MAVEL et G. MARTIN, C.R. Acad. Sci 252, 110 (1961)

110) S.P.L. SÖRENSEN, C.R. Trav. Lab. Carlsberg 8, 1 (1909)
(Biochemisches Taschenbuch, p. 649, Springer-Verlag (Berlin 1956)

111) V. DANTCHAKOFF, C.R. Soc. Biol. 120, 597 (1935)
E. WOLFF et A. GINGLINGER, C.R. Soc. Biol. 120, 114 (1935)

112) J.H. VIVIEN et collaborateurs, Communication personnelle

113) S. MAY et J.H. VIVIEN, Diplôme d'Etudes Supérieures
(Strasbourg 1962)

114) J.D. WEILL, S. BUSCH, P. CHAMBON et P. MANDEL, Biochem. and
Biophys. Research Comm. 10, 122 (1963)

115) P. MANDEL et collaborateurs, communication personnelle.

TABLE DES MATIERES

Page

INTRODUCTION 1

CHAPITRE I : PHOSPHATES DE STEROÏDES 5

I) Acide déhydroépiandrostérone-phosphorique 8

A) Phosphorylation de la déhydroépiandrostérone par l'oxychlorure de phosphore 9

B) Phosphorylation de la déhydroépiandrostérone par le dichlorure de morpholyle-phosphoryle 13

C) Phosphorylation de la déhydroépiandrostérone par le phosphate de 2-cyanoéthyle en présence de DCC 15

D) Caractérisation du dichlorure de déhydroépiandrostérone-phosphoryle 20

E) Caractérisation de l'acide déhydroépiandrostérone-phosphorique 21

II) Acide bis-déhydroépiandrostérone-phosphorique 24

III) Autres acides stéroïde-phosphoriques 27

IV) Propriétés physiques des acides stéroïde-phosphoriques 28

CHAPITRE II : PHOSPHORAMIDATES DE STEROÏDES 30

I) Phosphomorpholidates d'oestrone..... 31

II) Phosphomorpholidates de déhydroépiandrostérone 34

A) Chloro-morpholino-phosphate 34

B) Dimorpholino-phosphate 35

C) Déhydroépiandrostérone-phosphomorpholidate de morpholinium 35

III) Propriétés spectrales : spectres I.R. ... 37

spectres de R.M.N. 39

CHAPITRE III : METHYL-PHOSPHONATES DE STEROIDES ET DE TERPENES 42

Propriétés physiques: spectres de R.M.N. 43

spectres I.R. 44

CHAPITRE IV : PREMIERE PREPARATION DU PYROPHOSPHATE P_1-OESTRONE, P_2-ADENOSINE 49

Caractérisation 54

CHAPITRE V : COMPARAISON DE METHODES DE CONDENSATION D'ESTERS PHOSPHORIQUES

Introduction - Méthode expérimentale 56

I) Condensation en présence d'un agent déshydratant

A) Dicyclohexylcarbodiimide 60

B) Trichloracétonitrile 64

C) Diméthylcyanamide 65

D) Isocyanate de n-butyle 66

II) Condensation en présence de phosphoramidates et phosphomorpholidates 68

III) Condensation par substitution d'anions 71

Tableaux comparatifs

Nouvelle méthode de condensation aux chloro-morpholino-phosphates 73

CHAPITRE VI : SYNTHESE DE STEROYL-NUCLEOTIDES PAR SUBSTITUTION D'ANIONS 74

Pyrophosphate P_1-oestrone, P_2-adénosine 78

Autres stéroyl-nucléotides 80

Pyrophosphate symétrique P_1, P_2-dioestrone 82

Phosphomorpholidates de stéroïdes 83

CHAPITRE VII : ETUDE PAR RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE DES METHOXYLES LIES AU PHOSPHORE 84

A) Déplacements chimiques 84

B) Couplage 85

C) Effets stériques 86

D) Dédoublement des signaux des méthyles liés au phosphore 87

E) Dosage des acides phosphoriques et phosphoniques par R.M.N. 88

PARTIE EXPERIMENTALE 90

CONCLUSION 114

APPENDICE : Activités physiologiques, biologiques et pharmacodynamiques 117

BIBLIOGRAPHIE 121

Propositions données par la Faculté
ou, éventuellement, seconde thèse :

STRUCTURE DE POLYPEPTIDES DOUES DE PROPRIETES HORMONALES

Strasbourg, le 18 Juin 1963

Le Président de Thèse

J.H. VIVIEN

Vu
Strasbourg, le 19 Juin 1963

LE DOYEN
G. MILLOT

Vu et permis d'imprimer
Strasbourg, le 20 Juin 1963

Le RECTEUR, de l'Académie de Strasbourg
Président du Conseil de l'Université

J.F. ANGELLOZ